

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-246885

(43) 公開日 平成5年(1993)9月24日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	弁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/24		8314-4C		
37/02	A A M	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平4-357539

(22) 出願日 平成4年(1992)12月24日

(31) 優先権主張番号 特願平3-356662

(32) 優先日 平3(1991)12月26日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72) 発明者 田平 武

東京都小平市小川東町4-1-1、I-20

(72) 発明者 小西 吉裕

東京都小金井市関野町1-1-6-101

(74) 代理人 弁理士 成瀬 勝夫 (外2名)

(54) 【発明の名称】 脳機能障害による疾患の予防・治療薬

(57) 【要約】

【目的】 アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症を始とする細胞生存延長作用及び／又はアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用が有効な各種の脳機能障害による疾患の予防と治療に有用な予防・治療薬を提供する。

【構成】 エリスロポイエチン、顆粒球コロニー刺激因子及びマクロファージコロニー刺激因子から選ばれた1種又は2種以上の造血因子を有効成分として含有する脳機能障害による疾患の予防・治療薬である。

【効果】 優れた細胞生存延長作用及びChAT賦活作用を有し、しかも、副作用が低いことから、アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症を始とする脳機能障害による各種の疾患に適用する医薬として有用である。

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 10165-042-999
SERIAL NUMBER: 10/573,905
REFERENCE: B08

【特許請求の範囲】

【請求項1】 エリスロポイエチン、顆粒球コロニー刺激因子及びマクロファージコロニー刺激因子から選ばれた1種又は2種以上の造血因子を有効成分として含有する脳機能障害による疾患の予防・治療薬。

【請求項2】 脳機能障害による疾患が、細胞生存延長作用及び／又はアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用が有効な疾患である請求項1記載の脳機能障害による痴呆症の予防・治療薬。

【請求項3】 脳機能障害による疾患が、アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症である請求項1記載の脳機能障害による疾患の予防・治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、脳機能障害による疾患を予防し、また、治療するために使用される治療薬に係り、更に詳しくは、エリスロポイエチン、顆粒球コロニー刺激因子又はマクロファージコロニー刺激因子を有効成分とする脳機能障害による疾患の予防・治療薬に関する。

【0002】

【従来の技術】脳機能障害による疾患には、遺伝性で進行が早いアルツハイマー病や、老人になって発病し、非遺伝性で進行が遅いアルツハイマー型老人性痴呆症や、脳梗塞、脳出血等の脳虚血障害、脳循環障害に伴うと考えられている記憶障害、知能障害、意欲低下、注意力低下等の脳血管性痴呆症が知られている。そして、これらの疾患では、その大きな特徴として発病初期に記憶障害という症状が顕著に現れるが、これは、疾患の進行の初期に大脳基底核のコリン作動性の神経細胞が比較的選択的に変性脱落することに起因するものと考えられている。この様な脳機能障害による疾患は、特に近年における老年人口が急増する中で社会問題化しつつあり、医薬業界においてもこれらの疾患を根本的に予防し、治療するための治療薬の開発が急務とされている。

【0003】そこで、従来においても、この様な疾患の発病のメカニズムと共にその治療薬の開発も種々の方面から検討され、幾つかの治療薬の開発の試みがされている。例えば、アルツハイマー型老人性痴呆症が脳内のコリン作動性神経系の機能低下、すなわち脳内のアセチルコリン量の低下を伴うことから、この脳内のアセチルコリン量を増加させる目的で、アセチルコリン前駆体物質やアセチルコリン分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼの活性を阻害するアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の使用が提案され、実際にもアセチルコリンエステラーゼ阻害剤としてフィソスチグミン、テトラヒドロアミノアクリジン等の使用が提案されている。しかしながら、これらの薬剤は、アルツハイマー型老人性痴呆症を始めとする脳機能障害による疾患に対する治療効果が十

分でなく、しかも、好ましくない副作用がある等の問題がある。

【0004】また、最近では、上記と同様に脳内のアセチルコリン量を増加させる目的ではあるが、上記のアセチルコリンエステラーゼ阻害作用を利用するものではなく、アセチルコリン合成酵素であるアセチルコリントランスフェラーゼ（ChAT）の活性を賦活するアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用（ChAT賦活作用）を有する物質の使用が提案され、実際に、インターロイキン3（IL-3）を有効成分とする老人性痴呆症の治療・予防薬〔特開平3-93,728号公報、Kamegai et al. Neuron, 4, 429~436 (March 1990)、Kamegai et al. Brain Research, 532, 323~325 (1990)〕や、神経成長因子（nerve growth factor: NGF）が交感神経、感覚神経、前脳コリン作動性神経細胞等に作用してその分化や成熟を促進し、生存、機能維持に有効であること〔Dev. Brain Res. 9, 45~52 (1983)〕、Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) がin vitroで神経の栄養因子としての作用を有すること〔Kamegai et al. Brain Research, 532, 323~325 (1990)〕等が報告されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明者らは、脳機能障害による疾患がその特徴として発病初期に記憶障害という症状を伴い、大脳基底核のコリン作動性の神経細胞が比較的選択的に変性脱落することに着目し、このコリン作動性の神経細胞の変性脱落を予防し、また、治療できる治療薬の開発について鋭意研究を重ねた結果、造血因子であるエリスロポイエチン（EPO）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）及びマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）が優れた細胞生存延長作用とアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用とを有し、脳機能障害による疾患の予防と治療に有効であることを見出し、本発明に到達した。

【0006】従って、本発明の目的は、脳機能障害による各種の疾患の予防と治療に有効である予防・治療薬を提供することにある。また、本発明の目的は、細胞生存延長作用及び／又はアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用が有効な疾患の予防と治療に有効である予防・治療薬を提供することにある。更に、本発明の目的は、アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症の予防と治療に有効である予防・治療薬を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、エリスロポイ

エチン、顆粒球コロニー刺激因子及びマクロファージコロニー刺激因子から選ばれた1種又は2種以上の造血因子を有効成分として含有する脳機能障害による疾患の予防・治療薬である。

【0008】本発明で有効成分として使用する造血因子のエリスロポイエチン、顆粒球コロニー刺激因子及びマクロファージコロニー刺激因子については、造血因子としての本質的作用を奏する限り、それが如何なる方法で製造されたものでもよいと考えられる。すなわち、天然から抽出したものでもよいし、遺伝子組換技術により製造したものでもよい。また、この際、その形質転換細胞は原核細胞又は真核細胞の何れであってもよい。

【0009】すなわち、エリスロポイエチン(EPO)については、例えば、ヒト再生不良性貧血患者の尿から抽出して得られた天然のヒトEPO(特公平1-38, 800号公報)や、ヒトEPOのアミノ酸配列に対応するメッセンジャーRNA(mRNA)を採取し、そのmRNAを利用して組換DNA体を作成し、次いで適当な宿主(例えば、大腸菌の如き菌類や、酵母類や、植物の細胞株や、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、マウスC-127細胞等の動物の細胞株等)で生産させる遺伝子組換技術により製造されたもの[例えば、特公平1-44, 317号公報、Kenneth Jacobs等, Nature, 313, 806~810(1985)]等を挙げることができる。そして、具体的には、例えば、天然ヒト尿EPO、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を宿主として産生させた遺伝子組換ヒトEPOであるrhEPO/CHO等のEPOが挙げられる。

【0010】また、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)については、例えば、ヒトG-CSF産生細胞を培養し、その培養上澄から抽出、分離、精製して得られた天然のヒトG-CSF(特公平1-44, 200号公報)や、遺伝子組換によって大腸菌や動物細胞等の宿主を形質転換して得た形質転換体から産生せしめこれを単離精製したもの又はそれを化学修飾したもの等を挙げることができる(例えば、特公平2-5, 395号、特開昭62-129, 298号、特開昭62-132, 899号、特開昭62-236, 488号、特開昭64-85, 098号の各公報)。そして、具体的には、例えば、天然ヒトG-CSF、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を宿主として産生させた遺伝子組換ヒトG-CSFであるrhG-CSF/CHO、大腸菌(E. coli.)を宿主として産生させた遺伝子組換ヒトG-CSFであるrhG-CSF/E. coli.等のG-CSFが挙げられる。

【0011】更に、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)についても、例えば、人の尿等の生体試料から抽出、分離、精製して得られた天然のヒトM-CSF(例えば、特開昭64-22, 899号、特開平3

-17, 021号の各公報)や、遺伝子組換技術により製造されたもの(例えば、特表昭62-501, 607号、特表平1-502, 397号の各公報)等を挙げることができる。そして、具体的には、例えば、天然ヒトM-CSF、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を宿主として産生させた遺伝子組換ヒトM-CSFであるrhM-CSF/CHO、大腸菌(E. coli.)を宿主として産生させた遺伝子組換ヒトM-CSFであるrhM-CSF/E. coli.等のM-CSFが挙げられる。

【0012】この様なEPO、G-CSF又はM-CSFの投与経路としては、外科的に脳内に直接薬剤を投与する脳内投与や、脳脊髄液内に直接薬剤を注射する脳脊髄液内投与が考えられ、また、静脈内注射等も可能性が期待される。

【0013】そして、これらEPO、G-CSF又はM-CSFの投与量については、対象となる疾患やその病状等を配慮して適宜決定できるものであるが、投与量については、EPOの場合が通常成人1人当たり0.1~500 μ g、好ましくは5~100 μ gであり、また、G-CSFの場合が通常成人1人当たり0.1~1,000 μ g、好ましくは1~700 μ gであり、更に、M-CSFの場合が通常成人1人当たり0.1~1,000 μ g、好ましくは1~700 μ gである。

【0014】更に、本発明のEPO、G-CSF又はM-CSFを有効成分とする製剤については、その投与方法や剤型に応じて必要により、懸濁化剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤等を添加することができる。ここで、懸濁化剤の例としては例えばメチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等を挙げることができ、溶解補助剤としては例えばポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マグロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等を挙げることができ、安定化剤としては例えばヒト血清アルブミン、デキストラン40、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウム等を挙げることができ、等張化剤としては例えばD-マンニトール、ソルビトール等を挙げることができ、また、保存剤としては例えばパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等を挙げることができ、更に、吸着防止剤としては例えばヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキサイド・プロピレンオキサイド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。

【0015】次に、以下に本発明の効果を確認するための実験例を示す。

〔1〕初代培養細胞の調製

胎児期15日のBALB/マウス（三共実験サービス、東京）から前脳基底を含んだ中隔野を得た。ハンクスの平衡塩類溶液（HBSS溶液、pH7.4）中で組織を摘出して細断し、これを37℃で3分間0.03%のトリプシンを含んだHBSS溶液（pH6.5）で処理した。63 μ mのナイロンメッシュで濾過した後、無血清培地に再度懸濁した。培養は、細胞 6×10^5 個/mlで開始した。細胞の培養開始時にマウス β NGF（m β NGF、シグマ社、ミズリー州）100ng/ml、リコンビナントヒトマクロファージコロニー刺激因子（rhM-CSF）（ゲンザイム社製、米国マサチューセッツ州）10CFU/ml、50CFU/ml又は100CFU/ml、リコンビナントヒト顆粒球コロニー刺激因子（rhG-CSF）（中外製薬株式会社製）10CFU/ml、50CFU/ml又は100CFU/ml、若しくはリコンビナントヒトエリスロポイエチン（rhEPO）（中外製薬株式会社製）1IU/ml、5IU/ml又は10IU/mlをそれぞれ加え、3日後に培養液交換を行い、5日目に細胞をラバーポリスマン（ガラス管の先にゴムを嵌め込んだ器具）で回収し、下記の方法でコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）活性を測定した。結果を表1に示す。なお、無血清培地は、4.5g/lのグルコースを含むダルベッコの修正したイーグル培地（DMEM）（ギブコ社製、米国ニューヨーク州）と下記の成分を補足したHamのF12（ギブコ社製）（pH7.4）との1:1の混合物であった。すなわち、15mMのHEPES緩衝液、30nMのセレン酸ナトリウム、1%のペニシリン-ストレプトマイシン溶液（ギブコ社製）、100 μ g/mlのヒトトランスフェリン、25 μ /mlのウシ結晶化インシュリン、20nMのプロゲステロン、20nMのヒドロコルチゾン-21-リン酸塩、10mMのL-カルニチン、30nMの3,3',5-トリヨード-L-サイロニン、7ng/mlのトコフェロール、7ng/mlのレチノール、1 μ Mのチオクト酸、及び、1 μ l/mlのミネラル混合物〔Hutchingsら、P. N. A. S., 75, 901~904（1978）〕である。化合物は、特別に記載がない限り、シグマ社（米国ルイジアナ州又はミズリー州）製を使用した。

【0016】〔2〕SN6.10.2.2の培養細胞の調製

米国シカゴ大学に保管されており、この大学のWainer博士から提供されたSN6.10.2.2細胞は、マウス中隔野神経細胞とマウス神経芽細胞腫N18TG2との融合雑種細胞として樹立されたSN6細胞〔Hammondら、Science, 234, 1237~1240（1986）〕のサブクローンである。細胞は、10%ウシ胎児血清を含むDMEM中に維持した。使用の前

に、細胞 2×10^5 個/mlをHBSS溶液（pH7.4）で2回、無血清培地で1回洗浄した。rhM-CSF、rhG-CSF又はrhEPOを含んだ試験培地で35mm皿（ベクトン・ディッキンソン社製、米国ニュージャージー州）中で2日間培養した後、3日目に細胞をラバーポリスマンで回収し、下記の方法でChAT活性を測定した。結果を表2に示す。

【0017】〔3〕Fimbria（海馬采）-Fornix（脳弓）切断による脳内in vivoモデルの作製

体重300~350gのWister系アルビノ雄ラット（日本クレア、東京）を30~50mg/kgのペンタバルビタールナトリウム（sodium pentobarbital）で麻酔し、頭部を脳定位装置（ナリシゲ器械社、東京）に固定した。次いで、以下に示す手順でFimbria-Fornix切断を行った。すなわち、左側頭蓋骨のBregmaより0.5mm後方の線及び正中線を直交二辺とする3mm角の部分切除し、左背側のFimbriaとFornixを皮質と共に吸引除去した。右側頭蓋骨のBregmaから0.2mm前方及び正中線より1mm右側の位置に穿孔し、この孔に直径1mmのカニューレ（クニイ社、東京）を挿入した。このカニューレを通じて、125IU./15 μ l/dayあるいは12.5IU./15 μ l/dayの2doseのrhEPOを各々ラット3匹からなる実験群に4日間連続投与した。対照群として、5 μ g/15 μ l/dayの β -NGFあるいは15 μ l/dayの生理食塩水を上記と同じ条件下で投与した。

【0018】術後14日目のラットに2mg/kgのジイソプロピルフルオロフォスフェート（diisopropyl fluorophosphate）を筋肉内投与し、4時間後に100mlの生理食塩水並びに300mlの4%パラホルムアルデヒド（paraformaldehyde）及び0.1%のグルタルアルデヒド（glutaraldehyde）を含む冷却した0.1Mリン酸緩衝液で灌流した。脳を摘出して、2%ザンボーニ（Zamboni）液で4日間固定した後、4℃の10%蔗糖溶液中に一晩静置した。厚さ20 μ mの脳冠状切片を作成し、ブッチャーらの方法〔Butcher et al. Neuron, 7, 197~208（1991）〕の改法で染色した。ゲイジらの方法〔Gage et al. Neuroscience, 19, 241~255（1986）〕に従い、アセチルコリンエステラーゼ（AChE）陽性細胞、すなわち内側中隔野の主軸沿いに存在する最小直径12 μ mの神経細胞を画像解析ソフトウェア（オリンパス光学社、東京）を用いて調べた。個々の動物のFimbria-Fornix切断側及び反対側の両方の中隔野領域について、AChE陽性細胞の数を計測し、切断側に存在するAChE陽性細胞数を反対側に存在する細胞数で割っ

たパーセンテージをアセチルコリン作動性神経細胞の生存率とした。結果を図1に示す。なお、図中のカラムは $\text{Mean} \pm 1 \text{ S. D.}$ であり、**は $p < 0.01$ を示し、また、EPO-Hは $125 \text{ I. U.} / 15 \mu\text{l} / \text{day}$ 投与群を、EPO-Lは $12.5 \text{ I. U.} / 15 \mu\text{l} / \text{day}$ 投与群をそれぞれ示す。

【0019】〔4〕コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性の測定及び蛋白質の定量

ChAT活性は、Fonnumの方法 (F. Fonnum, J. Neurochem., 24, 407~409 (1975)) に基づいて求めた。すなわち、上記の初代培養細胞あるいはSN6.10.2培養細胞をラバーボリスマンで回収した後、 $30 \mu\text{l}$ の 10 mM-EDTA 液中でホモジナイズし、更に最終濃度 0.5% (v/v) Triton-X100を加えたものを酵素源とした。酵素反応溶液は 300 mM-NaCl 、 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH} 7.4$)、 20 mM-EDTA に基質として 0.2 mM ($1-^{14}\text{C}$) acetyl-CoA (アマシャム ジャパン社より購入) 及び $8 \text{ mM-Choline bromide}$ 及びアセチルコリンエステラーゼ阻害剤として $0.1 \text{ mM-Physostigmine}$ を加えたものである。この反応溶液 $5 \mu\text{l}$ を*

* 1. 5 ml のマイクロチューブ (エッペンドルフ社製、ドイツ) に入れ、酵素液サンプル $2 \mu\text{l}$ を加えて軽く振とう攪拌し、 37°C で 15 分間反応させた。氷冷することによって反応を停止させ、マイクロチューブを液体シンチレーション用バイアルの中に入れて中身の反応混液を 5 ml の $10 \text{ mM-Phosphate buffer}$ で洗いだした。このバイアルに 10 mg/ml のカリグノスト (Sodium Tetraphenylborate) を含む 2 ml のアセトニトリルと 10 ml のトルエン系シンチレーターを加え、 1 分間軽く振とうした。バイアルを 10 分間静置した後、液体シンチレーションカウンターによって ^{14}C で標識されたアセチルコリンの量を決定し、ChAT活性を求めた。

【0020】また、蛋白質の定量は、ローリー法 (Lowryら, J. Biol. Chem., 193, 265~275 (1951)) に従って行った。この目的で上述の酵素液サンプルの $10 \mu\text{l}$ を使用した。そして、これらの値を基に比活性、総蛋白量及び総ChAT活性をそれぞれ算出した。ChAT活性、タンパク質濃度及び生存率については $t\text{-test}$ を行った。

【0021】

【表1】

	n	ChAT比活性 (P moles/ng /min) (mean \pm SD)	相対 ChAT 比活 性 ^{a)}	総蛋白量 ($\mu\text{g/well}$) (mean \pm SD)	相対 総蛋白 量 ^{b)}	総ChAT活性 (P moles/hr /well) ^{c)} (mean \pm SD)	相対 総Ch AT活 性 ^{d)}
Control	5	13.2 ± 0.9	100	119.5 ± 19.9	100	93.9 ± 11.0	100
$\alpha\text{-BNGP}$ (ng/ml) 100	4	21.8 ± 2.2	161	146.7 ± 25.6	123	185.3 ± 23.1	197
$\Delta\text{N-CSP}$ (CFU/ml) 10 50 100	3 3 3	12.8 ± 2.4 15.5 ± 0.7 15.5 ± 0.7	97 117 117	148.7 ± 17.6 171.7 ± 18.1 137.8 ± 2.9	125 144 115	112.3 ± 14.1 159.4 ± 13.5 128.1 ± 8.2	120 170 137
$\Delta\text{G-CSP}$ (CFU/ml) 10 50 100	3 3 3	13.3 ± 1.9 16.5 ± 2.7 16.0 ± 1.5	101 125 114	133.5 ± 32.4 147.8 ± 12.4 140.9 ± 15.8	112 124 118	107.2 ± 31.3 145.1 ± 20.1 125.2 ± 4.0	114 155 133
ΔBPO (IU/ml) 1 5 10	3 3 3	11.9 ± 0.8 15.9 ± 2.3 15.8 ± 0.7	90 120 118	137.0 ± 21.2 149.5 ± 20.5 164.6 ± 31.3	131 125 138	111.5 ± 8.1 140.3 ± 5.0 152.4 ± 22.7	119 149 162

(注)

$$a: \text{相対ChAT比活性} = \frac{(\text{サンプルのChAT比活性})}{(\text{ControlのChAT比活性})} \times 100$$

$$b: \text{相対総蛋白量} = \frac{(\text{サンプルの総蛋白量})}{(\text{Controlの総蛋白量})} \times 100$$

$$c: \text{総ChAT活性} = \text{ChAT比活性} \times \text{総蛋白量}$$

$$d: \text{相対総ChAT活性} = \frac{(\text{サンプルの総ChAT活性})}{(\text{Controlの総ChAT活性})} \times 100$$

【0022】

【表2】

	n	ChAT比活性 (P moles/ mg/min)	相対Ch AT比活 性 ^{a)}	総蛋白量 μg/well	相対総 蛋白量 ^{b)}	総ChAT活性 (P moles/ hr/well) ^{c)}	相対総 ChAT活 性 ^{d)}
Control	1	20.2	100	147.1	100	179.2	100
rhM-CSF (CFU/ml) 50	1	34.1	168	157.1	107	322.2	180
rhG-CSF (CFU/ml) 50	1	32.6	161	146.6	100	283.5	158
rhEPO (IU/ml) 10	1	38.5	180	142.6	97	311.7	174

(注) a、b、c及びdは、表1の場合と同じである。

【0023】上記表1に示す結果から明らかなように、中隔野神経細胞の初代培養系に本発明のrhM-CSF、rhG-CSF又はrhEPOを表中に示すDoseで添加したときの5日後のChAT比活性、総蛋白量及び総ChAT活性を調べた結果は、rhM-CSFの場合にはControlに対してDose:10CFU/ml、50CFU/ml及び100CFU/mlで総蛋白量をそれぞれ25%、44%及び15%増加させ、rhG-CSFの場合にはControlに対してDose:10CFU/ml、50CFU/ml及び100CFU/mlで総蛋白量をそれぞれ12%、24%及び18%増加させ、また、rhEPOの場合にはControlに対してDose:1IU/ml、5IU/ml及び10IU/mlで総蛋白量をそれぞれ31%、25%及び38%増加させた。これらの値は、対照として実験したmβNGF(100ng/ml)の場合の効果23%と同等あるいはそれ以上の結果を示すものであり、本発明で使用する造血因子類が神経栄養因子のmβNGFと類似の作用を発揮し、初代培養神経細胞の生存を促進することが判明した。

【0024】また、ChAT比活性に関しては、Controlに対して、rhM-CSFがDose:50CFU/ml及び100CFU/mlでそれぞれ17%増加させ、rhG-CSFがDose:10CFU/ml、50CFU/ml及び100CFU/mlでそれぞれ1%、25%及び14%増加させ、また、rhEPOがDose:5IU/ml及び10IU/mlでそれぞれ20%及び18%増加させた。更に、総ChAT活性については、Controlに対して、rhM-CSFがDose:10CFU/ml、50CFU/ml及び100CFU/mlでそれぞれ20%、70%及び37%増加させ、rhG-CSFがDose:10CFU/ml、50CFU/ml及び100CFU/mlでそれぞれ14%、55%及び33%増加させ、また、rhEPOがDose:1IU/ml、5IU/ml及び10IU/mlでそれぞれ19%、49%及び62%増加させた。これらの結果から、本発明で使用する造血因子、

rhM-CSF、rhG-CSF又はrhEPOは、ChAT賦活作用においても優れた効果を発揮することが判明した。

【0025】更に、表2は、SN6.10.2.2細胞のChAT比活性、総蛋白量及び総ChAT活性に対する本発明のrhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOの影響を示すもので、この系では、総蛋白量がControlの場合と造血因子を添加した場合とでほとんど変化していないことから分かるように、造血因子類の分化形質に対してのみの影響を単独で観察することができる。この実験の結果から明らかなように、rhM-CSF(50CFU/ml)、rhG-CSF(50CFU/ml)及びrhEPO(10IU/ml)は、ChAT比活性をそれぞれ61%、68%及び80%上昇させ、また、総ChAT活性をそれぞれ80%、58%及び74%上昇させた。

【0026】また、図1に示したように、rhEPO投与群では、対照群(生理食塩水、0.1%BSA)に比べて片側性にFimbria-Fornix切断したラットの中隔野におけるAchE陽性細胞の生存率が有意に改善された。片側性にFimbria-Fornix切断したラットの中隔野で、rhEPOのアセチルコリン作動性神経細胞に対するin vivoの効果が確認されたことは、実際の臨床的展開を考える上で意義深い。

【0027】

【作用】以上の実験から明らかなように、本発明のrhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOは、元々血液細胞系に対して作用を有するものとして発見された造血因子であるが、中枢神経細胞系に対してもmβNGFと同様の活性を有することが判明した。すなわち、マウス中隔野神経細胞のin vitro初代培養において総蛋白量を顕著に増加させると共にChAT比活性や総ChAT活性を増加させ、また、マウス中隔野由来コリン作動性神経細胞株SN6.10.2.2細胞においてもChAT比活性や総ChAT活性を増加させ、従って、これらの造血因子、rhM-CSF、rhG-CSF及びrh

EPOは、優れた細胞生存延長作用を発揮すると共にChAT賦活作用を発揮するという二通りの作用を発揮する。更に、*in vivo*の実験、すなわちFimbria-Fornixの神経経路切断系においてもアセチルコリン作動性神経細胞の生存を支持する効果が認められた。この系では、海馬で産生され軸索を逆行性に運ばれてくるNGFの供給が切断によって途絶えるために、中隔野のアセチルコリン作動性神経細胞はその供給を受けることができなくなり死滅する。従って、*in vivo*においてrhEPOがNGF様のNeurotrophic Factor活性を持つことが明らかとなった。

【0028】このため、本発明のrhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOは、コリン作動性の神経細胞が変性脱落して記憶障害をもたらすような疾患、例えばアルツハイマー病やアルツハイマー型老人性痴呆症等に対して有効であるほか、脳梗塞、脳出血等の脳虚血障害、脳循環障害に伴うと考えられている記憶障害、知能障害、意欲低下、注意力低下等の脳血管性痴呆症等に対しても有効である。しかるに、本発明の造血因子、rhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOの適応疾患は、上記の如きコリン作動性神経細胞が関与する疾患に限られるものではない。すなわち、中枢神経細胞系に対するmβNGFはその作用が末梢交感神経あるいは感覚神経や脳のコリン作動性神経に限られて比較的狭い細胞特異性を有するのに対し、本発明のrhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOは元来血球系の細胞に対する因子であり、脳のより広範な種類の神経細胞にたいして生存促進因子として作用する可能性を有するものと考えられ、これが優れた細胞生存延長作用を発揮する要因であると考えられる。このため、本発明のrhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOは、単にコリン作動性神経細胞が関与する疾患に限られるものではなく、例えば、大脳基底核黒質のドーパミン作動性神経細胞が変性脱落して生じるパーキンソン病や、大脳基底核の線条体（尾状核、被殻）のGABA作動性神経細胞が変性脱落して生じるハンチントン舞蹈病等、広く脳機能障害による疾患の予防薬として、又は、治療薬として有望である。

【0029】

【実施例】以下、製剤に関する実施例を示す。

実施例1

エリスロポイエチン 8 μg
注射用蒸留水にて全量 2 ml
上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

【0030】実施例2

エリスロポイエチン 8 μg
注射用蒸留水にて全量 2 ml
上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注

し、凍結乾燥して密封した。

【0031】実施例3

エリスロポイエチン 16 μg
注射用蒸留水にて全量 2 ml
上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

【0032】実施例4

エリスロポイエチン 16 μg
注射用蒸留水にて全量 2 ml
上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

【0033】実施例5

エリスロポイエチン 8 μg
ヒト血清アルブミン 5 mg
注射用蒸留水にて全量 2 ml
上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

【0034】実施例6

エリスロポイエチン 8 μg
ヒト血清アルブミン 5 mg
注射用蒸留水にて全量 2 ml
上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

【0035】実施例7

エリスロポイエチン 16 μg
ヒト血清アルブミン 5 mg
注射用蒸留水にて全量 2 ml
上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

【0036】実施例8

エリスロポイエチン 16 μg
ヒト血清アルブミン 5 mg
注射用蒸留水にて全量 2 ml
上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

【0037】実施例9～12

実施例5～8におけるヒト血清アルブミンに代えて5 mgのデキストラン40を用い、これら実施例5～8と同様にして注射剤を調製した。

40 【0038】実施例13

注射用蒸留水100 ml中にD-マンニトール5 g、エリスロポイエチン1 mg、ヒト血清アルブミン100 mgを無菌的に溶解して水溶液を調製し、1 mlずつバイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

【0039】実施例14

pH7.0の0.05 M-リン酸緩衝液50 ml中にエリスロポイエチン0.5 mgとソルビトール1 gとを無菌的に溶解して水溶液を調製し、0.5 mlずつバイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。別に0.1%-メチルセルロース水溶液を無菌的に調製し、1 mlずつ

アンプルに分注し、溶解用溶液とした。

【0040】実施例15

精製されたヒトG-CSF (10mM-リン酸緩衝液pH7.0)の75 μ g/ml及びD-マンニトールの15mg/mlを注射用蒸留水に溶解して0.3mlとした後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃

以下の冷暗所で行う。

【0041】実施例16

精製されたヒトG-CSF (10mM-リン酸緩衝液pH7.0)の50 μ g/mlをNaClで浸透圧比を1に調整した後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃以下の冷暗所で行う。

【0042】実施例17

精製されたヒトG-CSF (10mM-リン酸緩衝液pH7.0)の100 μ g/mlをNaClで浸透圧比を1に調整した後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃以下の冷暗所で行う。

【0043】実施例18

精製されたヒトG-CSF (10mM-リン酸緩衝液pH7.0)の50 μ g/mlにHSA濃度10mg/ml及びD-マンニトール濃度50mg/mlとなるように加えて溶解した後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤は室温以下の温度条件で保存し、使用時に注射用蒸留水で希釈して使用する。

【0044】実施例19

精製されたヒトG-CSF (10mM-リン酸緩衝液p

H7.0)の100 μ g/mlにゼラチン濃度10mg/ml及びD-マンニトール濃度50mg/mlとなるように加えて溶解した後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤は室温以下の温度条件で保存し、使用時に注射用蒸留水で希釈して使用する。

10 【0045】実施例20

精製されたヒトM-CSF (10mM-リン酸緩衝液pH7.0)の75 μ g/ml及びD-マンニトールの15mg/mlを注射用蒸留水に溶解して0.3mlとした後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃以下の冷暗所で行う。

20 【0046】実施例21

精製されたヒトM-CSF (10mM-リン酸緩衝液pH7.0)の50 μ g/mlをNaClで浸透圧比を1に調整した後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃以下の冷暗所で行う。

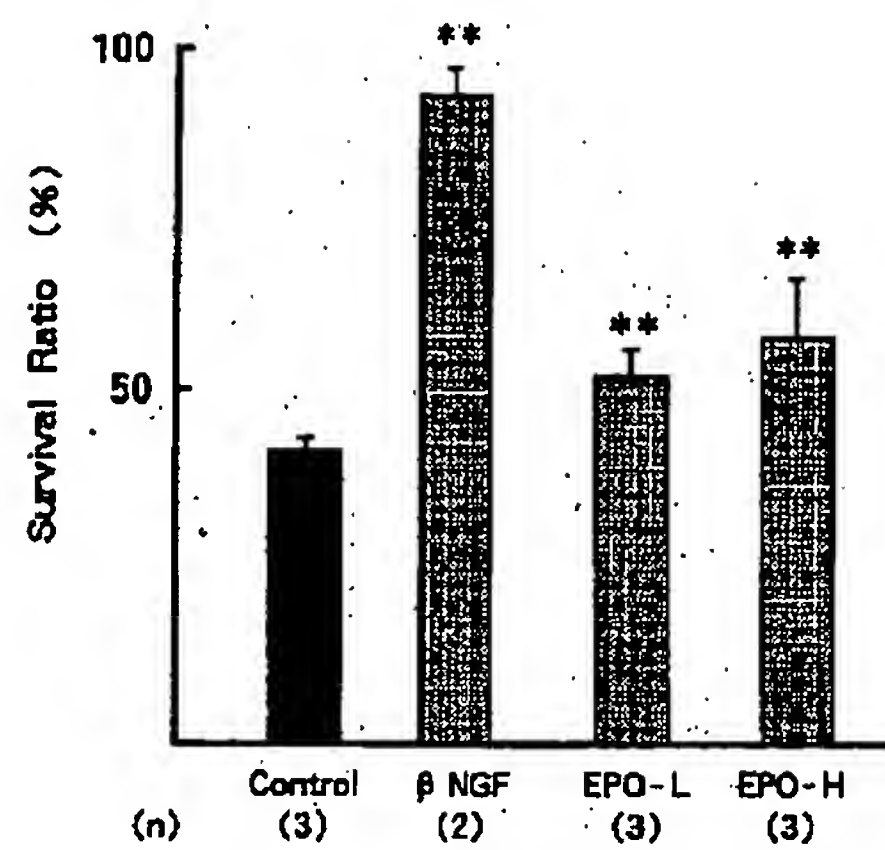
【0047】

30 【発明の効果】本発明のrhM-CSF、rhG-CSF又はrhEPOを有効成分として含有する予防・治療薬は、優れた細胞生存延長作用及びChAT賦活作用を有し、しかも、副作用が低いことから、アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症を始とする脳機能障害による各種の疾患に適用する医薬として有用である。

【図面の簡単な説明】

40 【図1】 図1は実験例〔3〕で得られた脳内in vivoモデルにおけるrhEPOの細胞生存延長効果を示すグラフ図であり、図中、縦軸は細胞の相対的な生存率を、また、横軸は実験群をそれぞれ示す。

【図1】



THOMSON

DERWENT

(C) DERWENT

JP5-246885-A

THOMSON
★
DERWENT

(32)【優先日】
平3 (1991) 12月26日

(32)[DATEOFEARLIESTCLAIMEDPRIORITY]
Heisei 3 (1991) December 26th

(33)【優先権主張国】
日本 (JP)

(33)[COUNTRYOFEARLIESTPRIORITY]
Japan (JP)

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】
000003311

[IDCODE]
000003311

【氏名又は名称】
中外製薬株式会社

Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. K.K.

【住所又は居所】
東京都北区浮間5丁目5番1号

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 田平 武

Takeshi Tahira

【住所又は居所】
東京都小平市小川東町4-1-1、1-20

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 小西 吉裕

Yoshihiro Konishi

【住所又は居所】
東京都小金井市関野町1-1-6-101

[ADDRESS]

(74)【代理人】

(74)[PATENTAGENT]

【弁理士】

[PATENTATTORNEY]

【氏名又は名称】
成瀬 勝夫 (外2名)

Katsuo Naruse (et al.)

(57)【要約】**【目的】**

アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症を始とする細胞生存延長作用及び／又はアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用が有効な各種の脳機能障害による疾患の予防と治療に有用な予防・治療薬を提供する。

【構成】

エリスロポイエチン、顆粒球コロニー刺激因子及びマクロファージコロニー刺激因子から選ばれた1種又は2種以上の造血因子を有効成分として含有する脳機能障害による疾患の予防・治療薬である。

【効果】

優れた細胞生存延長作用及びChAT賦活作用を有し、しかも、副作用が低いことから、アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症を始とする脳機能障害による各種の疾患に適用する医薬として有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

エリスロポイエチン、顆粒球コロニー刺激因子及びマクロファージコロニー刺激因子から選ばれた1種又は2種以上の造血因子を有効成分として含有する脳機能障害による疾患の予防・治

(57)[SUMMARY]**[OBJECT]**

The useful preventive and therapeutic agent is provided to the prevention and the treatment of the disease by the various cerebral-function damage with effective the cell survival extension actions including an Alzheimer's disease, the Alzheimer type senile dementia, or a cerebrovascular dementia and/or an acetylcholine transferase activation action.

[SUMMARY OF THE INVENTION]

It is the preventive and therapeutic agent of the disease by cerebral-function damage which contains the hemopoiesis factor of one or two kinds or more chosen out of erythropoietin, the granulocyte colony-stimulating factor, and the macrophage colony stimulating factor as an active ingredient.

[EFFECTS]

Since it has a cell survival extension action and ChAT activation action which were excellent and side effects are moreover low, it is useful as a pharmaceutical used for the various disease by the cerebral-function damage including an Alzheimer's disease, the Alzheimer type senile dementia, or a cerebrovascular dementia.

[CLAIMS]**[CLAIM 1]**

Preventive and therapeutic agent of the disease by cerebral-function damage which contains the hemopoiesis factor of one or two kinds or more chosen out of erythropoietin, the granulocyte colony-stimulating factor, and the macrophage colony stimulating factor as an active ingredient.

療薬。

【請求項 2】

脳機能障害による疾患が、細胞生存延長作用及び／又はアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用が有効な疾患である請求項 1 記載の脳機能障害による痴呆症の予防・治療薬。

[CLAIM 2]

The disease by cerebral-function damage is disease with effective a cell survival extension action and/or an acetylcholine transferase activation action. Preventive and therapeutic agent of the dementia by cerebral-function damage of Claim 1.

【請求項 3】

脳機能障害による疾患が、アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症である請求項 1 記載の脳機能障害による疾患の予防・治療薬。

[CLAIM 3]

The disease by cerebral-function damage is an Alzheimer's disease, the Alzheimer type senile dementia, or a cerebrovascular dementia. Preventive and therapeutic agent of the disease by cerebral-function damage of Claim 1.

【発明の詳細な説明】**[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]****【0001】****[0001]****【産業上の利用分野】**

この発明は、脳機能障害による疾患を予防し、また、治療するために使用される治療薬に係り、更に詳しくは、エリスロポイエチン、顆粒球コロニー刺激因子又はマクロファージコロニー刺激因子を有効成分とする脳機能障害による疾患の予防・治療薬に関する。

[INDUSTRIAL APPLICATION]

This invention relates to the therapeutic agent used in order to prevent and treat the disease by cerebral-function damage. Specifically, it is related with the preventive and therapeutic agent of the disease by cerebral-function damage which make an active ingredient erythropoietin, a granulocyte colony-stimulating factor, or a macrophage colony stimulating factor.

【0002】**[0002]****【従来技術】**

脳機能障害による疾患には、遺伝性で進行が早いアルツハイマー病や、老人になって発病し、非遺伝性で進行が遅いアルツハ

[PRIOR ART]

Disease by cerebral-function damage, an Alzheimer's disease with an early advance at heredity, an Alzheimer type senile dementia with a slow advance at the non-heredity with which elderly people onset a disease, Cerebral-

イマー型老人性痴呆症や、脳梗塞、脳出血等の脳虚血障害、脳循環障害に伴うと考えられている記憶障害、知能障害、意欲低下、注意力低下等の脳血管性痴呆症が知られている。そして、これらの疾患では、その大きな特徴として発病初期に記憶障害という症状が顕著に現れるが、これは、疾患の進行の初期に大脳基底核のコリン作動性の神経細胞が比較的選択的に変性脱落することに起因するものと考えられている。このような脳機能障害による疾患は、特に近年における老年人口が急増する中で社会問題化しつつあり、医薬業界においてもこれらの疾患を根本的に予防し、治療するための治療薬の開発が急務とされている。

【0003】

そこで、従来においても、このような疾患の発病のメカニズムと共にその治療薬の開発も種々の方面から検討され、幾つかの治療薬の開発の試みがされている。例えば、アルツハイマー型老人性痴呆症が脳内のコリン作動性神経系の機能低下、すなわち脳内のアセチルコリン量の低下を伴うことから、この脳内のアセチルコリン量を増加させる目的で、アセチルコリン前駆体物質やアセチルコリン分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼの活性を阻害するアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の使用が提案され、実際にもアセチルコリンエステラーゼ阻害剤としてフィゾスチグミン、テトラ

ischemia damage of a cerebral infarction, the cerebral hemorrhage, etc., Cerebrovascular dementias, such as the dysmnnesia considered to accompany to cerebral-circulation damage, intelligence damage, a volition reduction, and a caution force reduction, are known.

And, with these disease, the symptom of the dysmnnesia appears notably in the disease onset initial stage as the big characteristic.

However, it is considered that it originates that cholinergic neuron cerebrum basal ganglia carrying out the degeneration dropping off of this comparatively selectively at the initial stage of advance of the disease.

In particular the disease by such cerebral-function damage has been formed into a social problem in the senility population in recent years increasing rapidly.

Also in the pharmaceutical industry, these disease are prevented fundamentally.

Development of the therapeutic agent for treating is made into pressing need.

[0003]

Then, also in conventionally, with the mechanism of disease onset of such disease, development of the therapeutic agent is also examined from various directions, and the trial of development of several therapeutic agent is carried out.

Since the Alzheimer type senile dementia, for example, accompanies the function lowering of the cholinergic nervous system in a brain, that is, reduction of the amount of acetylcholine in a brain, for the objective which makes the amount of acetylcholine in this brain increase, use of the acetylcholinesterase inhibitor which obstructs the activity of an acetylcholine precursor substance, or the acetylcholinesterase which is an acetylcholine degradation enzyme is proposed.

Also in fact, use of the physostigmine, the tetrahydro amino acridine, etc. is proposed as an acetylcholinesterase inhibitor.

However, these medical agents do not have a

ヒドロアミノアクリジン等の使用が提案されている。しかしながら、これらの薬剤は、アルツハイマー型老人性痴呆症を始めとする脳機能障害による疾患に対する治療効果が十分でなく、しかも、好ましくない副作用がある等の問題がある。

【0004】

また、最近では、上記と同様に脳内のアセチルコリン量を増加させる目的ではあるが、上記のアセチルコリンエステラーゼ阻害作用を利用するものではなく、アセチルコリン合成酵素であるアセチルコリントランスフェラーゼ (ChAT) の活性を賦活するアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用 (ChAT賦活作用) を有する物質の使用が提案され、実際に、インターロイキン3 (IL-3) を有効成分とする老人性痴呆症の治療・予防薬 [特開平3-93,728号公報、Kamegai et al. Neuron, 4, 429~436 (March 1990)、Kamegai et al. Brain Research, 532, 323~325 (1990)] や、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) が交感神経、感覚神経、前脳コリン作動性神経細胞等に作用してその分化や成熟を促進し、生存、機能維持に有効であること [Dev. Brain Res. 9, 45~52 (1983)]、Granulocyte-Macrophage Colon

sufficient therapeutic effect with respect to the disease by the cerebral-function damage including the Alzheimer type senile dementia. And, there are problems, that is, there are side effects which are not preferable.

[0004]

Recently, Although it is the objective which makes the amount of acetylcholine in a brain increase like the above, use of not the thing using the acetylcholinesterase inhibitory effect of the above but the substance which has an acetylcholine transferase activation action (ChAT activation action) which activates the activity of acetylcholine transferase (ChAT) which is an acetylcholine synthetase is proposed. Actually, the treatment and preventive agent of the senile dementia which make an interleukin 3 (IL-3) an active ingredient [Unexamined-Japanese-Patent 3-93,728 gazette, Kamegai et al. Neuron, 4, 429-436 (March 1990), Kamegai et al. Brain Research, 532, 323-325 (1990)]

A nerve growth factor (nerve growth factor: NGF) acts on a sympathetic nerve, a sensory nerve, a forebrain cholinergic neuron, etc., accelerates the differentiation and maturing, and is effective in survival and a function maintenance. [Dev. Brain Res. 9, 45-52 (1983)], Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) has the action as a nervous nutrition factor by in vitro. [Kamegai et al. Brain Research, 532, 323-325 (1990),] etc. are reported.

γ -Stimulating Factor (GM-CSF) が *in vitro* で神経の栄養因子としての作用を有すること [Kamegai et al. Brain Research, 532, 323~325 (1990)] 等が報告されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者らは、脳機能障害による疾患がその特徴として発病初期に記憶障害という症状を伴い、大脳基底核のコリン作動性の神経細胞が比較的選択的に変性脱落することに着目し、このコリン作動性の神経細胞の変性脱落を予防し、また、治療できる治療薬の開発について鋭意研究を重ねた結果、造血因子であるエリスロポイエチン (EPO)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 及びマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) が優れた細胞生存延長作用とアセチルコリントランスフェラーゼ賦活作用とを有し、脳機能障害による疾患の予防と治療に有効であることを見出し、本発明に到達した。

【0006】

従って、本発明の目的は、脳機能障害による各種の疾患の予防と治療に有効である予防・治療薬を提供することにある。また、本発明の目的は、細胞生存延長

[0005]

[PROBLEM ADDRESSED]

Then, present inventors direct its attention, Disease by cerebral-function damage, the symptom of the dysmnnesia is accompanied to the disease onset initial stage, and the cholinergic neuron of cerebrum basal ganglia carries out degeneration omission comparatively selectively as the characteristic. This cholinergic nerve-cell-degeneration omission is prevented.

Moreover, research was earnestly piled up about development of the therapeutic agent which can be treated.

As a result, it discovered that the erythropoietin (EPO) which is a hemopoiesis factor, a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), and a macrophage colony stimulating factor (M-CSF) have a cell survival extension action and an acetylcholine transferase activation action which were excellent.

It is effective in the prevention and the treatment of the disease by cerebral-function damage.

This invention was reached.

[0006]

Therefore, objective of the invention is to provide the effective preventive and therapeutic agent in the prevention and the treatment of the various disease by cerebral-function damage.

Moreover, objective of the invention is to provide the effective preventive and therapeutic

作用及び／又はアセチルコリン
トランスフェラーゼ賦活作用が
有効な疾患の予防と治療に有効
である予防・治療薬を提供する
ことにある。更に、本発明の目
的は、アルツハイマー病、アル
ツハイマー型老人性痴呆症又は
脳血管性痴呆症の予防と治療に
有効である予防・治療薬を提供
することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、エリスロポイエチン、
顆粒球コロニー刺激因子及びマ
クロファージコロニー刺激因子
から選ばれた1種又は2種以上
の造血因子を有効成分として含
有する脳機能障害による疾患の
予防・治療薬である。

【0008】

本発明で有効成分として使用す
る造血因子のエリスロポイエチ
ン、顆粒球コロニー刺激因子及
びマクロファージコロニー刺激
因子については、造血因子とし
ての本質的作用を奏する限り、
それが如何なる方法で製造され
たものでもよいと考えられる。
すなわち、天然から抽出したも
のでもよいし、遺伝子組換技術
により製造したものでもよい。
また、この際、その形質転換細
胞は原核細胞又は真核細胞の何
れであってもよい。

【0009】

すなわち、エリスロポイエチン
(EPO)については、例えば、

agent in prevention and the treatment of the
disease with effective a cell survival extension
action and/or an acetylcholine transferase
activation action.

Furthermore, objective of the invention is to
provide the effective preventive and therapeutic
agent in prevention and the treatment of an
Alzheimer's disease, the Alzheimer type senile
dementia, or a cerebrovascular dementia.

[0007]

[SOLUTION OF THE INVENTION]

This invention is the preventive and therapeutic
agent of the disease by cerebral-function
damage which contains the hemopoiesis factor
of one or two kinds or more chosen out of
erythropoietin, the granulocyte colony-
stimulating factor, and the macrophage colony
stimulating factor as an active ingredient.

[0008]

About the erythropoietin, the granulocyte
colony-stimulating factor and the macrophage
colony stimulating factor of the hemopoiesis
factor used as an active ingredient by this
invention, as long as the essential action as a
hemopoiesis factor is produced, it is considered
that the thing was produced by which method is
also possible.

That is, the thing was extracted from nature is
also possible. The thing was produced with the
genetic-recombination technique is also
possible.

Moreover, the any one of a prokaryotic cell or
an eukaryotic cell is sufficient as the
transformed cell in this case.

[0009]

That is, about erythropoietin (EPO), For
example, the natural human EPO (Japanese-
Patent-Publication-No. 1-38,800 gazette) who

ヒト再生不良性貧血患者の尿から抽出して得られた天然のヒトEPO（特公平1-38,800号公報）や、ヒトEPOのアミノ酸配列に対応するメッセンジャーRNA（mRNA）を採取し、そのmRNAを利用して組換えDNA体を作成し、次いで適当な宿主（例えば、大腸菌の如き菌類や、酵母類や、植物の細胞株や、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、マウスC-127細胞等の動物の細胞株等）で生産させる遺伝子組換え技術により製造されたもの〔例えば、特公平1-44,317号公報、Kenneth Jacobs等, Nature, 313, 806~810(1985)〕等を挙げることができる。そして、具体的には、例えば、天然ヒト尿EPO、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）を宿主として産生させた遺伝子組換えヒトEPOであるrhEPO/CHO等のEPOが挙げられる。

【0010】

また、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）については、例えば、ヒトG-CSF産生細胞を培養し、その培養上澄から抽出、分離、精製して得られた天然のヒトG-CSF（特公平1-44,200号公報）や、遺伝子組換えによって大腸菌や動物細胞等の宿主を形質転換して得た形質転換体から産生せしめこれを単離精製したもの又はそれを化学修飾したもの等を挙げることができる（例えば、特公平

extracts and was obtained from a human aplastic-anemia patient's urine, the messenger ribonucleic acid (mRNA) corresponded to a human's EPO amino acid sequence is extracted, and the recombinant-DNA body is prepared using the mRNA.

Subsequently the thing produced with the genetic-recombination technique made to produce by suitable hosts (for example, the microbe like Escherichia coli, yeast, a plant cell strain, and cell strain of animals, such as COS cell, a Chinese hamster ovarian cell (CHO), mouse C-127 cell, etc., etc.) [for example, Japanese-Patent-Publication-No. 1-44,317 gazette, Kenneth Jacobs etc., Nature, 313,806-810(1985)], etc. can be mentioned.

And, rhEPO/CHO etc. EPO which is the genetic-recombination human EPO who made it produce, having made natural human urine EPO and the Chinese hamster ovarian cell (CHO) as the host is mentioned specifically, for example.

【0010】

About a granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), For example, natural human G-CSF which extracts, isolates and purifies and was obtained from the culture supernatant by cultivating a human G-CSF production cell (Japanese-Patent-Publication-No. 1-44,200 gazette), That which chemically modified the thing or it which was made to produce from the transformed body which transformed and obtained hosts, such as an Escherichia coli and an animal cell, by the genetic recombination, and isolate-purified this can be mentioned. (For example, each gazette of the Japanese Patent Publication No. of number 2-5,395, Unexamined Japanese Patent 62-129,298,

2-5, 395号、特開昭62-129, 298号、特開昭62-132, 899号、特開昭62-236, 488号、特開昭64-85, 098号の各公報)。そして、具体的には、例えば、天然ヒトG-CSF、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を宿主として産生させた遺伝子組換えヒトG-CSFであるrhG-CSF/CHO、大腸菌(E. coli.)を宿主として産生させた遺伝子組換えヒトG-CSFであるrhG-CSF/E. coli.等のG-CSFが挙げられる。

【0011】

更に、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)についても、例えば、人の尿等の生体試料から抽出、分離、精製して得られた天然のヒトM-CSF(例えば、特開昭64-22, 899号、特開平3-17, 021号の各公報)や、遺伝子組換え技術により製造されたもの(例えば、特表昭62-501, 607号、特表平1-502, 397号の各公報)等を挙げることができる。そして、具体的には、例えば、天然ヒトM-CSF、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)を宿主として産生させた遺伝子組換えヒトM-CSFであるrhM-CSF/CHO、大腸菌(E. coli.)を宿主として産生させた遺伝子組換えヒトM-CSFであるrhM-CSF/E. coli.等のM-CSFが挙げられる。

Unexamined Japanese Patent 62-132,899, Unexamined Japanese Patent 62-236,488, and Unexamined Japanese Patent 64-85,098).

Specifically, for example rhG-CSF/CHO which is genetic-recombination human G-CSF which made it produce, having made natural human G-CSF and the Chinese hamster ovarian cell (CHO) as the host, G-CSFs, such as rhG-CSF/E.coli. which is genetic-recombination human G-CSF which made it produce, having made the Escherichia coli (E. coli.) as the host, are mentioned.

[0011]

Furthermore, also about a macrophage colony stimulating factor (M-CSF), For example, natural human M-CSF which extracts, isolates and purifies and was obtained from biological samples, such as people's urine, (for example, each gazette of Unexamined Japanese Patent 64-22,899 and Unexamined Japanese Patent 3-17,021), the thing was produced with the genetic-recombination technique can be mentioned (for example, each gazette of the Patent-Publication of number 62-501,607, and the Patent Publication of number 1-502,397).

And, specifically, for example rhM-CSF/CHO which is genetic-recombination human M-CSF which made it produce, having made natural human M-CSF and the Chinese hamster ovarian cell (CHO) as the host, M-CSFs, such as rhM-CSF/E.coli. which is genetic-recombination human M-CSF which made it produce, having made the Escherichia coli (E. coli.) as the host, are mentioned.

【0012】

この様なEPO、G-CSF又はM-CSFの投与経路としては、外科的に脳内に直接薬剤を投与する脳内投与や、脳脊髄液内に直接薬剤を注射する脳脊髄液内投与が考えられ、また、静脈内注射等も可能性が期待される。

【0013】

そして、これらEPO、G-CSF又はM-CSFの投与量については、対象となる疾患やその病状等を配慮して適宜決定できるものであるが、投与量については、EPOの場合が通常成人1人当たり0.1～500 μ g、好ましくは5～100 μ gであり、また、G-CSFの場合が通常成人1人当たり0.1～1,000 μ g、好ましくは1～700 μ gであり、更に、M-CSFの場合が通常成人1人当たり0.1～1,000 μ g、好ましくは1～700 μ gである。

【0014】

更に、本発明のEPO、G-CSF又はM-CSFを有効成分とする製剤については、その投与方法や剤型に応じて必要により、懸濁化剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤等を添加することができる。ここで、懸濁化剤の例としては例えばメチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリ

【0012】

As an administration route of such EPO, G-CSF, or M-CSF, the administration in a brain which administers a direct medical agent in a brain surgically, and the administration in the cerebrospinal fluid which injects with a direct medical agent in the cerebrospinal fluid can be considered.

Moreover, possibility is expected an intravenous injection etc.

【0013】

And, about the dosage of these EPOs, G-CSF, or M-CSF, the disease, its condition of disease, etc. used as a subject are considered, and it can determine suitably.

About a dosage, in the case of EPO, it is 0.1-500 micro-g per normal adult. Preferably, it is 5-100 micro-g.

In moreover, the case of G-CSF It is 0.1-1,000 micro-g per normal adult. Preferably, it is 1-700 micro-g.

Furthermore, in the case of M-CSF, It is 0.1-1,000 micro-g per adult usually. Preferably, it is 1-700 micro-g.

【0014】

About the formulation which furthermore make an active ingredient EPO of this invention, G-CSF, or M-CSF, A suspending agent, a solubilizing agent, a stabilizer, an isotonicizing agent, a preservative, a adsorption inhibitor, etc. can be added if necessary depending on the administration method or a dosage form.

Here, as the example of a suspending agent, for example, a methyl cellulose, the polysorbate 80, a hydroxyethyl cellulose, gum arabic, a tragacanth powder, a sodium carboxymethylcellulose, a polyoxyethylene sorbitan mono-laurate, etc. can be mentioned. As a solubilizing agent, for example, the polyoxyethylene hydrogenated castor oil, the

ウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等を挙げることができる、溶解補助剤としては例えばポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート 80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マクロゴール、ヒマシ油脂肪酸エチルエステル等を挙げることができる、安定化剤としては例えばヒト血清アルブミン、デキストラン 40、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウム等を挙げることができる、等張化剤としては例えばD-マンニトール、ソルビトール等を挙げることができる、また、保存剤としては例えばパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロクロレゾール等を挙げることができる、更に、吸着防止剤としては例えばヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキサイド・プロピレンオキサイド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。

【0015】

次に、以下に本発明の効果を確認するための実験例を示す。

[1]

初代培養細胞の調製

胎児期 15 日の BALB/マウス (三共実験サービス、東京)

polysorbate 80, a nicotinamide, a polyoxyethylene sorbitan mono-laurate, the macrogol, castor-oil fatty-acid ethyl ester, etc. can be mentioned.

As a stabilizer, for example, a human serum albumin, the dextran 40, a methyl cellulose, gelatin, sodium sulfite, meta-sodium sulfite, etc. can be mentioned. As an isotonicizing agent, for example, D-mannitol, sorbitol, etc. can be mentioned. Moreover, as a preservative, for example, a paraoxy methyl benzoate, a paraoxy ethyl benzoate, sorbic acid, a phenol, cresol, the chlorocresol, etc. can be mentioned. Furthermore, as a adsorption inhibitor, for example, a human serum albumin, lecithin, a dextran, an ethylene-oxide - propylene-oxide copolymer, a hydroxy-propyl cellulose, a methyl cellulose, the polyoxyethylene hydrogenated castor oil, polyethyleneglycol, etc. can be mentioned.

[0015]

Next, the example of experiment for confirming this effect of the invention is shown below.

[1]

Preparation of a primary-culture cell

The septal area containing the forebrain base was obtained from BALB/mouse on fetus period

から前脳基底を含んだ中隔野を得た。ハンクスの平衡塩類溶液 (HBSS 溶液、pH 7.4) 中で組織を摘出して細断し、これを 37°C で 3 分間 0.03% のトリプシンを含んだ HBSS 溶液 (pH 6.5) で処理した。63 μ m のナイロンメッシュで濾過した後、無血清培地に再度懸濁した。培養は、細胞 6×10^5 個/ml で開始した。細胞の培養開始時にマウス β NGF (m β NGF、シグマ社、ミズリー州) 100 ng/ml、リコンビナントヒトマクロファージコロニー刺激因子 (rhM-CSF) (ゲンザイム社製、米国マサチューセッツ州) 10 CFU/ml、50 CFU/ml 又は 100 CFU/ml、リコンビナントヒト顆粒球コロニー刺激因子 (rhG-CSF) (中外製薬株式会社製) 10 CFU/ml、50 CFU/ml 又は 100 CFU/ml、若しくはリコンビナントヒトエリスロポイエチン (rhEPO) (中外製薬株式会社製) 1 IU/ml、5 IU/ml 又は 10 IU/ml をそれぞれ加え、3 日後に培養液交換を行い、5 日目に細胞をラバーポリスマン (ガラス管の先にゴムを嵌め込んだ器具) で回収し、下記の方法でコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性を測定した。結果を表 1 に示す。なお、無血清培地は、4.5 g/l のグルコースを含むダルベッコの修正したイーグル培地 (DMEM) (ギブコ社製、米国ニューヨーク州) と下記の成分を補足した Ham

15th (Sankyo Experiment Service, Tokyo).

The tissue was extracted and shredded in Hanks's balanced salt solution (HBSS solution, pH 7.4), and this was processed with HBSS solution (pH 6.5) which contained 0.03% of trypsin for 3 minutes by 37 degrees-Celsius.

After filtering in the nylon mesh of 63 micrometers, it suspended again to the serum free medium.

The culture was started in the 6×10^5 piece/ml cell.

At the time of culture start of a cell, Mouse (beta) NGF (m(beta) NGF, sigma company, Missouri state) 100 ng/ml, Human macrophage recombinant colony-stimulating-factor (rhM-CSF) (made by Genzyme Transgenics Corp., USA Massachusetts state) 10 CFU/ml, 50 CFU/ml or 100 CFUs/ml, Human recombinant granulocyte-colony-stimulating-factor (rhG-CSF) (made by Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) 10 CFU/ml, 50 CFU/ml or 100 CFUs/ml, or recombinant human erythropoietin (rhEPO) (made by Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) 1 IU/ml, 5 IU/ml, or 10 IUs/ml The above is each added and culture-solution exchange will be performed 3 days after. A cell is collected to a fifth day with a rubber policeman (instrument which inserted rubber in the point of a glass tube). The choline-acetyltransferase (ChAT) activity was measured by the following method.

A result is shown to Table 1.

In addition, the serum free medium was the mixture of 1:1 of the Dulbecco's modified eagle culture medium (DMEM) (made by a Gibco company, USA New York state) containing the glucose of 4.5 g/l, and F12 (made by a Gibco company) (pH 7.4) of Ham supplementary to the following component.

That is, HEPES buffer of 15 mM, the sodium selenate of 30 nm, 1% of a penicillin-streptomycin solution (made by a Gibco company), 100 micro-g/ml human transferrin, cattle crystallization insulin of 25 micro-/ml, the progesterone of 20 nm, the hydrocortisone-21-phosphate of 20 nm, L-carnitine of 10 mM, 30 nm 3,3',5-tri iodo- L- thyronine, 7 ng/ml tocopherol, 7 ng/ml retinol, thiocetic acid of 1

のF12 (ギブコ社製) (pH 7.4) との1:1の混合物であった。すなわち、15 mMのHEPES緩衝液、30 nMのセレン酸ナトリウム、1%のペニシリン-ストربتマイシン溶液 (ギブコ社製)、100 μ g/mlのヒトトランスフェリン、25 μ /mlのウシ結晶化インシュリン、20 nMのプロゲステロン、20 nMのヒドロコルチゾン-21-リン酸塩、10 mMのL-カルニチン、30 nMの3, 3', 5-トリヨード-L-サイロニン、7 ng/mlのトコフェロール、7 ng/mlのレチノール、1 μ Mのチオクト酸、及び、1 μ l/mlのミネラル混合物 [Hutchingsら, P. N. A. S., 75, 901~904 (1978)] である。化合物は、特別に記載がない限り、シグマ社 (米国レイジアナ州又はミズリー州) 製を使用した。

【0016】

[2]

SN6.10.2.2の培養細胞の調製
米国シカゴ大学に保管されており、この大学のWainer博士から提供されたSN6.10.2.2細胞は、マウス中隔野神経細胞とマウス神経芽細胞腫N18TG2との融合雑種細胞として樹立されたSN6細胞 [Hammondら, Science, 234, 1237~1240 (1986)] のサブクローンである。細胞は、10%ウシ胎児血

micro-M, and, 1 microliter/ml, It is the mineral mixture [Hutchings et al., P.N.A.S., 75,901-904 (1978)] of the above.

The compound used made by the sigma company (USA Louisiana state or Missouri state), as long as there was no description particularly.

[0016]

[2]

Preparation of the culture cell of SN6.10.2.2
SN6.10.2.2 cell which is stored to the USA Chicago university and provided from Dr. Wainer of this university is the sub-clone of SN6 cell [Hammond et al., Science, 234, 1237-1240 (1986)] established as a fusion hybrid cell of a mouse septal-area neuron and mouse neuroblastoma N18TG2.

The cell was maintained in DMEM which contains a fetal bovine serum 10%.

Before use, the 2×10^5 piece/ml cell was washed twice with HBSS solution (pH7.4) and once with the serum free medium.

After cultivating for 2 days in 35 mm dish

清を含むDMEM中に維持した。使用の前に、細胞 2×10^5 個/mlをHBSS溶液(pH 7.4)で2回、無血清培地で1回洗浄した。rhM-CSF、rhG-CSF又はrhEPOを含んだ試験培地で35mm皿(ベクトン デッキンソン社製、米国ニュージャージー州)中で2日間培養した後、3日目に細胞をラバーポリスマンで回収し、下記の方法でChAT活性を測定した。結果を表2に示す。

【0017】

[3]

Fimbria (海馬采) - Fornix (脳弓) 切断による脳内invivoモデルの作製
 体重300~350gのWister系アルビノ雄ラット(日本クレア、東京)を30~50mg/kgのペントバルビタルナトリウム(sodium pentobarbital)で麻酔し、頭部を脳定位装置(ナリシゲ器械社、東京)に固定した。次いで、以下に示す手順でFimbria-Fornix切断を行った。すなわち、左側頭蓋骨のBregmaより0.5mm後方の線及び正中線を直交二辺とする3mm角の部分を切除し、左背側のFimbriaとFornixを皮質と共に吸引除去した。右側頭蓋骨のBregmaから0.2mm前方及び正中線より1mm右側の位置に穿孔し、この孔に直径1mm

(made by a Becton Dickinson company, USA New-Jersey state) by the test culture medium containing rhM-CSF, rhG-CSF, or rhEPO, the cell was collected with the rubber policeman to the third day, and ChAT activity was measured by the following method.

A result is shown to Table 2.

[0017]

[3]

Preparation of invivo model in a brain by Fimbria(fimbria hippocampi)-Fornix (fornix) cutting

The Wister albino male rat (CLEA Japan, Tokyo) with a body weight of 300-350g was anesthetized with pentobarbital sodium (sodium pentobarbital) of 30-50 mg/kg, and the head was fixed to the brain stereotaxic instrument (Narishige Group, Tokyo).

Subsequently, the procedure shown below performed the Fimbria-Fornix cutting.

The part of 3 mm angle which make orthogonal-crossing 2 lines of the median line and the line of 0.5 mm back from Bregma of the left-hand-side cranial bones was excised. The suction removal was carried out left dorsal Fimbria and Fornix with the cortex. Punching is carried out to the position on the right-hand side of 1 mm from median line and 0.2 mm front from Bregma of the right-hand-side cranial bones.

Cannula (Kunii company, Tokyo) with a diameter of 1 mm was inserted in this hole. This cannula is passed.

RhEPO of 2 doses of 125I.U./15 microliter/day or 12.5I.U./15 microliter/day was administered

mのカニューレ（クニイ社、東京）を挿入した。このカニューレを通じて、 $125 \text{ I. U. } / 15 \mu\text{l} / \text{day}$ あるいは $12.5 \text{ I. U. } / 15 \mu\text{l} / \text{day}$ の2doseのrhEPOを各々ラット3匹からなる実験群に4日間連続投与した。対照群として、 $5 \mu\text{g} / 15 \mu\text{l} / \text{day}$ の β -NGFあるいは $15 \mu\text{l} / \text{day}$ の生理食塩水を上記と同じ条件下で投与した。

【0018】

術後14日目のラットに $2 \text{ mg} / \text{kg}$ のジイソプロピルフルオロフォスフェート (diisopropyl fluorophosphate) を筋肉内投与し、4時間後に 100 ml の生理食塩水並びに 300 ml の4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde) 及び0.1%のグルタルアルデヒド (glutaraldehyde) を含む冷却した0.1Mリン酸緩衝液で灌流した。脳を摘出して、2%ザンボニ (Zamboni) 液で4日間固定した後、 4°C の10%蔗糖溶液中に一晩静置した。厚さ $20 \mu\text{m}$ の脳冠状切片を作成し、ブッチャーらの方法 [Butcher et al. Neuron, 7, 197~208 (1991)] の改法で染色した。ゲイジらの方法 [Gage et al. Neuroscience, 19, 241~255 (1986)] に従い、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 陽性細胞、すなわち内側

continuously for 4 days to the each experimental group consisting of 3 rats.

As a control group, (beta)- NGF of 5 microg/15 microliter/day or the physiological saline of 15 microliter/day was administered on the same conditions as the above.

[0018]

The diisopropyl fluoro phosphate (diisopropyl fluorophosphate) of 2 mg/kgs is intramuscularly administered to the rat of a 14 -th day after the operation.

It perfused by cooled 0.1M phosphoric-acid buffer which contains the 100 ml physiological saline, 4% paraformaldehyde (paraformaldehyde) of 300 ml, and 0.1% of a glutaraldehyde (glutaraldehyde) 4 hours after.

A brain is extracted.

After fixing for 4 days with a Zamboni (Zamboni) liquid 2%, night still-standing was carried out in 10% sucrose solution of 4 degrees-Celsiuses.

The coronary brain slice of thickness 20 micrometer is prepared.

It stained by the method of a change method of Butcher et al. [Butcher et al. Neuron, 7, 197-208 (1991)].

According to the method [Gage et al. Neuroscience, 19, 241-255 (1986)] of Gage et al., the acetylcholinesterase (AChE) positive cell, that is, neuron of minimum diameter 12 micrometer which exists along in the main shaft of the inner-side septal area, was investigated using the image analysis soft ware (an Olympus optical company, Tokyo).

The number of AChE positive cells was measured about the Fimbria-Fornix cutting side of each animal, and the septal-area region of both of reverse sides. The percentage which divided the number of AChE positive cells which

中隔野の主軸沿いに存在する最小直径 $12\ \mu\text{m}$ の神経細胞を画像解析ソフトウェア（オリンパス光学社、東京）を用いて調べた。個々の動物の F i m b r i a - F o r n i x 切断側及び反対側の両方の中隔野領域について、A c h E 陽性細胞の数を計測し、切断側に存在する A c h E 陽性細胞数を反対側に存在する細胞数で割ったパーセンテージをアセチルコリン作動性神経細胞の生存率とした。結果を図 1 に示す。なお、図中のカラムは $\text{Mean} \pm 1\text{ S.D.}$ であり、** は $p < 0.01$ を示し、また、E P O - H は $125\text{ I.U.} / 15\ \mu\text{l} / \text{day}$ 投与群を、E P O - L は $12.5\text{ I.U.} / 15\ \mu\text{l} / \text{day}$ 投与群をそれぞれ示す。

【0019】

【4】

コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性の測定及び蛋白質の定量

ChAT 活性は、Fonnum の方法 [F. Fonnum, J. Neurochem., 24, 407~409 (1975)] に基づいて求めた。すなわち、上記の初代培養細胞あるいは SN 6.10.2.2 培養細胞をラバーポリスマンで回収した後、 $30\ \mu\text{l}$ の 10 mM -EDTA 液中でホモジナイズし、更に最終濃度 0.5% (v/v) Triton-X100 を加えたものを酵素源とした。酵素反応溶液は 300

exists in a cutting side by the number of cells which exists in a reverse side was made into the survival rate of an acetylcholinergic neuron.

A result is shown to Figure 1.

In addition, the column in a figure is $\text{Mean} \pm 1\text{ S.D.}$

** shows $p < 0.01$. Moreover, EPO-H show a $125\text{ I.U.} / 15\ \mu\text{l} / \text{day}$ administration group. EPO-L each show a $12.5\text{ I.U.} / 15\ \mu\text{l} / \text{day}$ administration group.

[0019]

【4】

A measurement of a choline-acetyltransferase (ChAT) activity, and a determination of protein

It calculated for ChAT activity based on the method [F. Fonnum, J. Neurochem., 24, 407-409 (1975)] of Fonnum.

That is, after collecting the primary-culture cell of the above, or SN 6.10.2.2 culture cell with a rubber policeman, it homogenized in the 10 mM -EDTA liquid of $30\ \mu\text{l}$, and that which added further final concentration 0.5% (v/v) Triton-X100 was made into the source of an enzyme.

The enzyme-reaction solution added 0.2 mM [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetyl-CoA (purchased from Amersham Japan company), 8 mM -Choline bromide as substrate and 0.1 mM -Physostigmine as an acetylcholinesterase inhibitor to 300 mM -NaCl, 50 mM sodium-

mM-NaCl, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4), 20 mM-EDTAに基質として0.2 mM [$1-^{14}\text{C}$] acetyl-CoA (アマシヤム ジャパン社より購入) 及び8 mM-Choline bromide 及びアセチルコリンエステラーゼ阻害剤として0.1 mM-Physostigmineを加えたものである。この反応溶液5 μl を1.5 mlのマイクロチューブ (エッペンドルフ社製、ドイツ) に入れ、酵素液サンプル2 μl を加えて軽く振とう攪拌し、37°Cで15分間反応させた。氷冷することによって反応を停止させ、マイクロチューブを液体シンチレーション用バイアルの中に入れて中身の反応混液を5 mlの10 mM-Phosphate bufferで洗いだした。このバイアルに10 mg/mlのカリグノスト (Sodium Tetrphenylborate) を含む2 mlのアセトニトリルと10 mlのトルエン系シンチレーターを加え、1分間軽く振とうした。バイアルを10分間静置した後、液体シンチレーションカウンターによって ^{14}C で標識されたアセチルコリンの量を決定し、ChAT活性を求めた。

【0020】

また、蛋白質の定量は、ローリー法 [Lowryら, J. Biol. Chem., 193, 265~275 (1951)] に従って行った。この目的で上述の酵

phosphate buffer (pH 7.4), and 20 mM-EDTA.

This reaction solution 5 microliter is put into a 1.5 ml micro tube (made by an Eppendorf company, Germany).

Enzyme liquid sample 2 microliter is added and shaking stir is carried out lightly.

15 minutes was made to react at 37 degrees-Celsius.

Reaction is stopped by freezing.

The vial for liquid scintillations put the micro tube in, and the cocktail of contents was probed by 5 ml 10 mM-Phosphate buffer.

2 ml acetonitrile and the 10 ml toluene type scintillator containing 10 mg/ml Kalignost (Sodium Tetrphenylborate) were added to this vial, and the shaking was carried out lightly 1 minute.

After standing 10 minutes of vials, by the liquid scintillation counter, quantity of the acetylcholine labeled by ^{14}C was determined, and it calculated for ChAT activity.

[0020]

Moreover, the determination of protein was performed according to the Lowry method [Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)].

10 microliters of an above-mentioned enzyme liquid sample were used for this objective.

素液サンプルの10 μ lを使用
 した。そして、これらの値を基
 に比活性、総蛋白量及び総Ch
 AT活性をそれぞれ算出した。
 ChAT活性、タンパク質濃度
 及び生存率についてはt-test
 を行った。

And, the specific activity, the total protein
 amount, and the total ChAT activity were each
 calculated on the basis of these value.

T-test was performed about ChAT activity,
 protein concentration, and the survival rate.

【0021】

【0021】

【表1】

【Table 1】

	n	ChAT比活性 (P moles/mg /min) (mean \pm SD)	相対 ChAT 比活 性 ^{a)}	総蛋白量 (μ g/well) (mean \pm SD)	相対 総蛋白 量 ^{b)}	総ChAT活性 (P moles/hr /well) ^{c)} (mean \pm SD)	相対 総Ch AT活 性 ^{d)}
Control	5	13.2 \pm 0.8	100	118.5 \pm 18.8	100	68.8 \pm 11.0	100
oBNGP (μ g/ml) 100	4	21.8 \pm 2.2	161	146.7 \pm 25.6	123	185.9 \pm 23.1	107
LM-CSP (CPD/ml) 10	8	12.8 \pm 2.4	97	148.7 \pm 17.8	125	112.3 \pm 14.1	120
50	3	15.5 \pm 0.7	117	171.7 \pm 16.1	144	159.4 \pm 13.5	170
100	9	15.5 \pm 0.7	117	137.8 \pm 2.8	115	128.1 \pm 8.2	137
hG-CSP (CPD/ml) 10	2	18.3 \pm 1.9	101	183.5 \pm 32.4	112	107.2 \pm 31.3	114
50	8	18.5 \pm 2.7	125	147.8 \pm 12.4	124	145.1 \pm 20.1	155
100	3	15.0 \pm 1.5	114	140.9 \pm 15.8	118	123.2 \pm 4.0	133
hRPD (10/ml) 1	3	11.8 \pm 0.8	90	157.0 \pm 21.2	131	111.6 \pm 8.1	118
5	3	15.9 \pm 2.3	120	148.5 \pm 20.5	125	140.3 \pm 5.8	149
10	3	15.8 \pm 0.7	118	164.8 \pm 31.3	138	152.4 \pm 22.7	162

(注)

$$a: \text{相対ChAT比活性} = \frac{(\text{サンプルのChAT比活性})}{(\text{ControlのChAT比活性})} \times 100$$

$$b: \text{相対総蛋白量} = \frac{(\text{サンプルの総蛋白量})}{(\text{Controlの総蛋白量})} \times 100$$

$$c: \text{総ChAT活性} = \text{ChAT比活性} \times \text{総蛋白量}$$

$$d: \text{相対総ChAT活性} = \frac{(\text{サンプルの総ChAT活性})}{(\text{Controlの総ChAT活性})} \times 100$$

Table 1

Row (left to right): ChAT specific activity, Relative ChAT specific activity,
 Total protein amount, Relative total protein amount, Total ChAT activity,
 Relative total ChAT activity.

(Note) a: Relative ChAT specific activity=(ChAT specific activity of
 Sample)/(ChAT specific activity of Control)x100, b: Relative total protein

amount=(total protein amount of Sample)/(total protein amount of Control)x100,

c: Total ChAT activity=ChAT activity x total protein amount,

d: Relative total ChAT activity=(total ChAT activity of Sample)/(total ChAT activity of Control)x100

【0022】

[0022]

【表2】

[Table 2]

	a	ChAT比活性 (P moles/ ng/min)	相対Ch AT比活 性 ^{a)}	総蛋白量 μg/well	相対総 蛋白量 ^{b)}	総ChAT活性 (P moles/ hr/well) ^{c)}	相対総 ChAT活 性 ^{d)}
Control	1	20.2	100	147.1	100	179.2	100
rhM-CSF (CFU/ml) 50	1	34.1	168	157.1	107	322.2	180
rhG-CSF (CFU/ml) 50	1	32.8	161	146.9	100	283.5	158
rhEPO (IU/ml) 10	1	38.5	190	142.8	97	311.7	174

(注) a、b、c及びdは、表1の場合と同じである。

Table 2

Row (left to right): ChAT specific activity, Relative ChAT specific activity,
Total protein amount, Relative total protein amount, Total ChAT activity,
Relative total ChAT activity

(Note) a,b,c and d are the same as Table 1

【0023】

上記表1に示す結果から明らか
なように、中隔野神経細胞の初
代培養系に本発明の rhM-C
SF、rhG-CSF又はrh
EPOを表中に示すDoseで
添加したときの5日後のChA
T比活性、総蛋白量及び総Ch
AT活性を調べた結果は、rh
M-CSFの場合にはCont
rolに対してDose:10

[0023]

Clearly from the result shown to above Table 1,
the result which investigated ChAT specific
activity, the total protein amount and the total
ChAT activity after 5 days when adding rhM-
CSF, rhG-CSF or rhEPO of this invention to the
primary-culture group of a septal-area neuron
by Dose shown all over a table, In the case of
rhM-CSF It is Dose:10 CFU/ml, 50 CFU/ml and
100 CFUs/ml with respect to Control. The total
protein amount is made to increase by 25%,
44% and 15%.

CFU/ml、50 CFU/ml 及び 100 CFU/ml で総蛋白量をそれぞれ 25%、44% 及び 15% 増加させ、rhG-CSF の場合には Control に対して Dose: 10 CFU/ml、50 CFU/ml 及び 100 CFU/ml で総蛋白量をそれぞれ 12%、24% 及び 18% 増加させ、また、rhEPO の場合には Control に対して Dose: 1 IU/ml、5 IU/ml 及び 10 IU/ml で総蛋白量をそれぞれ 31%、25% 及び 38% 増加させた。これらの値は、対照として実験した mβNGF (100 ng/ml) の場合の効果 23% と同等あるいはそれ以上の結果を示すものであり、本発明で使用する造血因子類が神経栄養因子の mβNGF と類似の作用を発揮し、初代培養神経細胞の生存を促進することが判明した。

【0024】

また、ChAT 比活性に関しては、Control に対して、rhM-CSF が Dose: 50 CFU/ml 及び 100 CFU/ml でそれぞれ 17% 増加させ、rhG-CSF が Dose: 10 CFU/ml、50 CFU/ml 及び 100 CFU/ml でそれぞれ 1%、25% 及び 14% 増加させ、また、rhEPO が Dose: 5 IU/ml 及び 10 IU/ml でそれぞれ 20% 及び 18% 増加させた。更に、総 ChAT 活性については、Control に対し

In the case of rhG-CSF It is Dose: 10 CFU/ml, 50 CFU/ml and 100 CFUs/ml with respect to Control. The total protein amount is made to increase by 12%, 24% and 18%.

In the case of rhEPO, It is Dose: 1 IU/ml, 5 IU/ml and 10 IUs/ml with respect to Control. The total protein amount was made to each increase by 31%, 25% and 38%.

These value shows the result of equivalent to 23% of the effects in the case of m (beta) NGF (100 ng/ml) in which it experimented as a control, or more.

The hemopoiesis factors used by this invention demonstrate an action similar to m (beta) NGF of a neurotrophic factor.

It became clear to accelerate survival of a primary-culture neuron.

【0024】

Moreover, it is related with ChAT specific activity. rhM-CSF makes it each increase 17% by Dose: 50 CFU/ml and 100 CFUs/ml with respect to Control.

RhG-CSF makes it each increase 1%, 25% and 14% by Dose: 10 CFU/ml, 50 CFU/ml, and 100 CFUs/ml.

Moreover, rhEPO made it each increase 20% and 18% by Dose: 5 IU/ml and 10 IUs/ml.

Furthermore, rhM-CSF makes it each increase 20%, 37% and 70% by Dose: 10 CFU/ml, 50 CFU/ml, and 100 CFUs/ml with respect to Control about the total ChAT activity.

RhG-CSF makes it each increase 14%, 55% and 33% by Dose: 10 CFU/ml, 50 CFU/ml, and 100 CFUs/ml.

て、rhM-CSFがDose:10CFU/ml、50CFU/ml及び100CFU/mlでそれぞれ20%、70%及び37%増加させ、rhG-CSFがDose:10CFU/ml、50CFU/ml及び100CFU/mlでそれぞれ14%、55%及び33%増加させ、また、rhEPOがDose:1IU/ml、5IU/ml及び10IU/mlでそれぞれ19%、49%及び62%増加させた。これらの結果から、本発明で使用する造血因子、rhM-CSF、rhG-CSF又はrhEPOは、ChAT賦活作用においても優れた効果を発揮することが判明した。

【0025】

更に、表2は、SN6.10.2.2細胞のChAT比活性、総蛋白量及び総ChAT活性に対する本発明のrhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOの影響を示すもので、この系では、総蛋白量がControlの場合と造血因子を添加した場合とでほとんど変化していないことから分かるように、造血因子類の分化形質に対してのみの影響を単独で観察することができる。この実験の結果から明らかのように、rhM-CSF(50CFU/ml)、rhG-CSF(50CFU/ml)及びrhEPO(10IU/ml)は、ChAT比活性をそれぞれ61%、68%及び80%上昇させ、また、総ChAT活性をそれぞれ80%、58%及び7

Moreover, rhEPO made it each increase 19%, 49% and 62% by Dose:1IU/ml, 5 IU/ml, and 10 IUs/ml.

From these results, demonstrating the effect which was excellent also in ChAT activation action made clear the hemopoiesis factor used by this invention, rhM-CSF, rhG-CSF, or rhEPO.

[0025]

Table 2 shows the ChAT specific activity of SN6.10.2.2 cell, the total protein amount, and rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO influence of this invention with respect to the total ChAT activity. In this group, influence only of with respect to the differentiation character of hemopoiesis factors can be independently observed so that it may understand also from hardly changing by the case where the total protein amount is Control, and the case where a hemopoiesis factor is added.

RhM-CSF(50CFU/ml), rhG-CSF(50CFU/ml) and (rhEPO (10 IU/ml)) ChAT specific activity are each clearly risen 61%, 68% and 80% from the result of this experiment.

Moreover, the total ChAT activity was each risen 80%, 58% and 74%.

4%上昇させた。

【0026】

また、図1に示したように、rhEPO投与群では、対照群(生理食塩水、0.1%BSA)に比べて片側性にFimbria-Fornix切断したラットの中隔野におけるAChE陽性細胞の生存率が有意に改善された。片側性にFimbria-Fornix切断したラットの中隔野で、rhEPOのアセチルコリン作動性神経細胞に対するin vivoの効果が確認されたことは、実際の臨床的展開を考える上で意義深い。

【0027】

【作用】

以上の実験から明らかなように、本発明のrhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOは、元々血液細胞系に対して作用を有するものとして発見された造血因子であるが、中枢神経細胞系に対してもmβNGFと同様の活性を有することが判明した。すなわち、マウス中隔野神経細胞のin vitro初代培養において総蛋白量を顕著に増加させると共にChAT比活性や総ChAT活性を増加させ、また、マウス中隔野由来コリン作動性神経細胞株SN6.10.2.2細胞においてもChAT比活性や総ChAT活性を増加させ、従って、これらの造血因子、rhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOは、優

[0026]

Moreover, as shown to Figure 1, by rhEPO administration group, the survival rate of AChE positive cell in the septal area of the rat which carried out the Fimbria-Fornix cutting at one side property compared with the control group (physiological saline, 0.1% BSA) has been improved significantly.

It is meaningful that the effect of invivo with respect to the acetylcholinergic neuron of rhEPO was confirmed by the septal area of the rat which carried out the Fimbria-Fornix cutting at one side property when considering actual clinical unfolding.

[0027]

[EFFECT]

RhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO of this invention are the hemopoiesis factor discovered as that which has an action with respect to a blood-cell system from the first clearly from the above experiment.

However, it became clear to have an activity similar to m(beta) NGF also with respect to a central neuron system.

That is, while making the total protein amount increase notably in in vitro primary culture of a mouse septal-area neuron, ChAT specific activity and the total ChAT activity are made to increase.

Moreover, ChAT specific activity and the total ChAT activity are made to increase also in mouse septal-area deriving cholinergic neuron strain SN6.10.2.2 cell.

Therefore, while these hemopoiesis factors, rhM-CSF, rhG-CSF, and rhEPO demonstrate a cell survival extension action which was excellent, they demonstrate 2 kinds of actions of demonstrating ChAT activation action.

Furthermore, the effect which supports

れた細胞生存延長作用を発揮すると共にChAT賦活作用を発揮するという二通りの作用を発揮する。更に、*in vivo*の実験、すなわちFimbria-Fornixの神経経路切断系においてもアセチルコリン作動性神経細胞の生存を支持する効果が認められた。この系では、海馬で産生され軸索を逆行性に運ばれてくるNGFの供給が切断によって途絶えるために、中隔野のアセチルコリン作動性神経細胞はその供給を受けることができなくなり死滅する。従って、*in vivo*においてrhEPOがNGF様のNeurotrophic Factor活性を持つことが明らかとなった。

q

【0028】

このため、本発明のrhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOは、コリン作動性の神経細胞が変性脱落して記憶障害をもたらすような疾患、例えばアルツハイマー病やアルツハイマー型老人性痴呆症等に対して有効であるほか、脳梗塞、脳出血等の脳虚血障害、脳循環障害に伴うと考えられている記憶障害、知能障害、意欲低下、注意力低下等の脳血管性痴呆症等に対しても有効である。しかるに、本発明の造血因子、rhM-CSF、rhG-CSF及びrhEPOの適応疾患は、上記の如きコリン作動性神経細胞が関与する疾患に限られるものではない。すなわち、中枢神経細胞系に対する $m\beta$ NGFはその作用

survival of an acetylcholinergic neuron also in the nerve path cutting group of experiment of *in vivo*, that is, Fimbria-Fornix, observed.

In order that supply of NGF which is produced by the hippocampus and carried by retrogression property in an axon may stop by cutting, in this group, the acetylcholinergic neuron of the septal area consists unable to receive the supply, and becomes extinct.

Therefore, that rhEPO has a NGF-like Neurotrophic Factor activity in *in vivo* became clear.

【0028】

Therefore, rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO of this invention, It is effective with respect to disease which a cholinergic neuron carries out degeneration dropping off, and brings the dysmnnesia to which, for example, Alzheimer's-disease or Alzheimer type senile-dementia etc. In addition, it is effective in cerebrovascular dementias, such as the dysmnnesia considered to accompany to cerebral-ischemia damage of a cerebral infarction, the cerebral hemorrhage, etc., and cerebral-circulation damage, intelligence damage, a volition reduction, and a caution force reduction, etc.

However, the adaptive disease of the hemopoiesis factor of this invention, rhM-CSF, rhG-CSF, and rhEPO is not restricted to the disease in which the above cholinergic neurons concern.

That is, $m(\beta)$ NGF with respect to a central neuron system, To the action being restricted to a peripheral sympathetic nerve or a sensory nerve, or a cerebral cholinergic nerve, and having comparatively narrow cell specificity

が末梢交感神経あるいは感覚神経や脳のコリン作動性神経に限られて比較的狭い細胞特異性を有するのに対し、本発明の rhM-CSF、rhG-CSF 及び rhEPO は元来血球系の細胞に対する因子であり、脳のより広範な種類の神経細胞にたいして生存促進因子として作用する可能性を有するものと考えられ、これが優れた細胞生存延長作用を発揮する要因であると考えられる。このため、本発明の rhM-CSF、rhG-CSF 及び rhEPO は、単にコリン作動性神経細胞が関与する疾患に限られるものではなく、例えば、大脳基底核黒質のドパミン作動性神経細胞が変性脱落して生じるパーキンソン病や、大脳基底核の線条体（尾状核、被殻）の GABA 作動性神経細胞が変性脱落して生じるハンチントン舞踏病等、広く脳機能障害による疾患の予防薬として、又は、治療薬として有望である。

【0029】

【実施例】

以下、製剤に関する実施例を示す。

実施例 1

エリスロポイエチン
 8 μ g

注射用蒸留水にて全量
 2 ml

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO of this invention are a factor with respect to the cell of a blood-cell system originally.

It is considered that it has possibility of acting as a survival promoter to the neuron of a kind more extensive in a brain.

It is considered that it is the factor which demonstrates a cell survival extension action in which this was excellent.

Therefore, rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO of this invention are not restricted to the disease in which a cholinergic neuron only concerns. For example, the Parkinson's disease which the dopaminergic neuron of a cerebrum basal-ganglia substantia nigra carries out degeneration dropping off, and produces in, the Huntington's chorea which GABAergic neuron of the striate body (a caudate nucleus, putamen) of cerebrum basal ganglia carries out degeneration dropping off, and produces in are widely promising as therapeutic agent as preventive agent of the disease by cerebral-function damage.

[0029]

[Example]

Hereafter, the Example about a formulation is shown.

Example 1

Erythropoietin 8 micro-g

It is the whole quantity at the water for injection.
 2 ml

The solution was sterilely prepared by the above composition ratio, and it dispensed and sealed to the vial container.

【0030】

実施例2

エリスロポイエチン

8 μ g

注射用蒸留水にて全量

2 ml

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

【0031】

実施例3

エリスロポイエチン

16 μ g

注射用蒸留水にて全量

2 ml

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

【0032】

実施例4

エリスロポイエチン

16 μ g

注射用蒸留水にて全量

2 ml

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

【0033】

実施例5

エリスロポイエチン

8 μ g

ヒト血清アルブミン

5 mg

注射用蒸留水にて全量

2 ml

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

【0030】

Example 2

Erythropoietin

8 micro-g

It is the whole quantity at the water for injection.

2 ml

A solution is sterilely prepared by the above composition ratio, and it dispensed to the vial container and it freeze-dried and sealed to it.

【0031】

Example 3

Erythropoietin

16 micro-g

It is the whole quantity at the water for injection.

2 ml

The solution was sterilely prepared by the above composition ratio, and it dispensed and sealed to the vial container.

【0032】

Example 4

Erythropoietin

16 micro-g

It is the whole quantity at the water for injection.

2 ml

A solution is sterilely prepared by the above composition ratio, and it dispensed to the vial container and it freeze-dried and sealed to it.

【0033】

Example 5

Erythropoietin

8 micro-g

Human serum albumin

5

mg

It is the whole quantity at the water for injection.

2 ml

The solution was sterilely prepared by the above composition ratio, and it dispensed and sealed to the vial container.

【0034】

実施例6

エリスロポイエチン

8 μ g

ヒト血清アルブミン

5 mg

注射用蒸留水にて全量

2 ml

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

[0034]

Example 6

Erythropoietin

8 micro-g

Human serum albumin

5

mg

It is the whole quantity at the water for injection.
2 ml

A solution is sterilely prepared by the above composition ratio, and it dispensed to the vial container and it freeze-dried and sealed to it.

【0035】

実施例7

エリスロポイエチン

16 μ g

ヒト血清アルブミン

5 mg

注射用蒸留水にて全量

2 ml

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、密封した。

[0035]

Example 7

Erythropoietin

16 micro-g

Human serum albumin

5

mg

It is the whole quantity at the water for injection.
2 ml

The solution was sterilely prepared by the above composition ratio, and it dispensed and sealed to the vial container.

【0036】

実施例8

エリスロポイエチン

16 μ g

ヒト血清アルブミン

5 mg

注射用蒸留水にて全量

2 ml

上記組成比で無菌的に溶液を調製し、バイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

[0036]

Example 8

Erythropoietin

16 micro-g

Human serum albumin

5

mg

It is the whole quantity at the water for injection.
2 ml

A solution is sterilely prepared by the above composition ratio, and it dispensed to the vial container and it freeze-dried and sealed to it.

【0037】

実施例9～12

実施例5～8におけるヒト血清アルブミンに代えて5 mgのデキストラン40を用い、これら実施例5～8と同様にして注射

[0037]

Example 9-12

It replaced with the human serum albumin in Example 5-8, and the injection was prepared like these Examples 5-8 using the 5 mg dextran 40.

剤を調製した。

【0038】

実施例 13

注射用蒸留水 100 ml 中に D-マンニトール 5 g、エリスロポイエチン 1 mg、ヒト血清アルブミン 100 mg を無菌的に溶解して水溶液を調製し、1 ml ずつバイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。

【0039】

実施例 14

pH 7.0 の 0.05 M-リン酸緩衝液 50 ml 中にエリスロポイエチン 0.5 mg とソルビトール 1 g とを無菌的に溶解して水溶液を調製し、0.5 ml ずつバイアル瓶に分注し、凍結乾燥して密封した。別に 0.1% -メチルセルロース水溶液を無菌的に調製し、1 ml ずつアンプルに分注し、溶解用溶液とした。

【0040】

実施例 15

精製されたヒト G-CSF (10 mM-リン酸緩衝液 pH 7.0) の $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 及び D-マンニトールの $15 \text{ mg}/\text{ml}$ を注射用蒸留水に溶解して 0.3 ml とした後、 $0.22 \mu\text{m}$ のポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存

[0038]

Example 13

D-mannitol 5g, erythropoietin 1 mg, and 100 mg of human serum albumins were dissolved sterily in 100 ml of water for injection, and aqueous solution was prepared.

It dispensed to the vial container and it freeze-dried and sealed 1 ml each to it.

[0039]

Example 14

In 50 ml of the 0.05M-phosphoric-acid buffer of pH7.0, erythropoietin 0.5 mg and sorbitol 1g were dissolved sterily, and aqueous solution was prepared.

0.5 ml was dispensed to each vial container. It freeze-dried and sealed.

0.1%-methyl-cellulose aqueous solution was prepared sterily independently.

1 ml was dispensed in each ampoule and it made as the solution for dissolution.

[0040]

Example 15

After dissolving 75 micro-g/ml of purified human G-CSF (10 mM-phosphoric-acid buffer pH7.0), and 15 mg/ml of D-mannitol in the water for injection, and making 0.3 ml, the filtration sterilization was carried out by the membrane filter which has the pore size of 0.22 micrometer.

It filled in the vial container which sterilized the obtained solution.

It caps halfway, and the rubber stopper sterilized similarly was continuously wound to the aluminium cap, and the solution formulation for injection was obtained.

Preservation of this solution formulation for injection is performed less than 10 degrees-Celsius in dark cold place.

は10℃以下の冷暗所で行う。

【0041】

実施例16

精製されたヒトG-CSF (10 mM-リン酸緩衝液 pH 7.0) の50 μ g/ml をNaClで浸透圧比を1に調整した後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃以下の冷暗所で行う。

【0042】

実施例17

精製されたヒトG-CSF (10 mM-リン酸緩衝液 pH 7.0) の100 μ g/ml をNaClで浸透圧比を1に調整した後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃以下の冷暗所で行う。

【0043】

実施例18

精製されたヒトG-CSF (10 mM-リン酸緩衝液 pH 7.0) の50 μ g/ml にHSA濃度10 mg/ml 及びD-マ

[0041]

Example 16

After adjusting 50 micro-g/ml of purified human G-CSF (10 mM-phosphoric-acid buffer pH7.0) to the osmotic-pressure ratio 1 by NaCl, the filtration sterilization was carried out by the membrane filter which has the pore size of 0.22 micrometer.

It filled in the vial container which sterilized the obtained solution.

It caps, and the rubber stopper sterilized similarly was continuously wound to the aluminium cap, and the solution formulation for injection was obtained.

Preservation of this solution formulation for injection is performed less than 10 degrees-Celsius in dark cold place.

[0042]

Example 17

After adjusting 100 micro-g/ml of purified human G-CSF (10 mM-phosphoric-acid buffer pH7.0) to the osmotic-pressure ratio 1 by NaCl, the filtration sterilization was carried out by the membrane filter which has the pore size of 0.22 micrometer.

It filled in the vial container which sterilized the obtained solution.

It caps, and the rubber stopper sterilized similarly was continuously wound to the aluminium cap, and the solution formulation for injection was obtained.

Preservation of this solution formulation for injection is performed less than 10 degrees-Celsius in dark cold place.

[0043]

Example 18

After dissolving so as to become 10 mg/ml HSA concentration and 50 mg/ml D-mannitol concentration in addition to 50 micro-g/ml of purified human G-CSF (10 mM-phosphoric-acid buffer pH7.0), the filtration sterilization was

ンニトール濃度 50 mg/ml となるように加えて溶解した後、0.22 μ m のポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤は室温以下の温度条件で保存し、使用時に注射用蒸留水で希釈して使用する。

【0044】

実施例 19

精製されたヒト G-CSF (10 mM-リン酸緩衝液 pH 7.0) の 100 μ g/ml にゼラチン濃度 10 mg/ml 及び D-マンニトール濃度 50 mg/ml となるように加えて溶解した後、0.22 μ m のポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤は室温以下の温度条件で保存し、使用時に注射用蒸留水で希釈して使用する。

【0045】

実施例 20

精製されたヒト M-CSF (10 mM-リン酸緩衝液 pH 7.0) の 75 μ g/ml 及び D-マンニトールの 15 mg/ml を注射用蒸留水に溶解して 0.3 ml とした後、0.22 μ m

carried out by the membrane filter which has the pore size of 0.22 micrometer.

It filled in the vial container which sterilized the obtained solution.

It caps halfway, and the rubber stopper sterilized similarly was continuously wound to the aluminium cap, and the solution formulation for injection was obtained.

This solution formulation for injection is preserved on the temperature conditions less than room temperature.

At the time of use, by the water for injection, it dilutes and it uses.

[0044]

Example 19

After dissolving so as to become 10 mg/ml gelatin concentration and 50 mg/ml D-mannitol concentration in addition to 100 micro-g/ml of purified human G-CSF (10 mM-phosphoric-acid buffer pH7.0), the filtration sterilization was carried out by the membrane filter which has the pore size of 0.22 micrometer.

It filled in the vial container which sterilized the obtained solution.

It caps halfway, and the rubber stopper sterilized similarly was continuously wound to the aluminium cap, and the solution formulation for injection was obtained.

This solution formulation for injection was preserved on the temperature conditions less than room temperature.

At the time of use, by the water for injection, it dilutes and it uses.

[0045]

Example 20

After dissolving 75 micro-g/ml of purified human M-CSF (10 mM-phosphoric-acid buffer pH7.0), and 15 mg/ml of D-mannitol in the water for injection, and making 0.3 ml, the filtration sterilization was carried out by the membrane filter which has the pore size of 0.22 micrometer.

のポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃以下の冷暗所で行う。

【0046】**実施例 21**

精製されたヒトM-CSF (10 mM-リン酸緩衝液 pH 7.0) の50 μ g/ml をNaClで浸透圧比を1に調整した後、0.22 μ mのポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌した。得られた溶液を滅菌処理したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を打栓し、続いてアルミニウムキャップに巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤の保存は10℃以下の冷暗所で行う。

【0047】**【発明の効果】**

本発明のrhM-CSF、rhG-CSF又はrhEPOを有効成分として含有する予防・治療薬は、優れた細胞生存延長作用及びChAT賦活作用を有し、しかも、副作用が低いことから、アルツハイマー病、アルツハイマー型老人性痴呆症又は脳血管性痴呆症を始とする脳機能障害による各種の疾患に適用する医薬として有用である。

It filled in the vial container which sterilized the obtained solution.

It caps halfway, and the rubber stopper sterilized similarly was continuously wound to the aluminium cap, and the solution formulation for injection was obtained.

Preservation of this solution formulation for injection is performed less than 10 degrees-Celsius in dark cold place.

[0046]**Example 21**

After adjusting 50 micro-g/ml of purified human M-CSF (10 mM-phosphoric-acid buffer pH7.0) to the osmotic-pressure ratio 1 by NaCl, the filtration sterilization was carried out by the membrane filter which has the pore size of 0.22 micrometer.

It filled in the vial container which sterilized the obtained solution.

It caps, and the rubber stopper sterilized similarly was continuously wound to the aluminium cap, and the solution formulation for injection was obtained.

Preservation of this solution formulation for injection is performed less than 10 degrees-Celsius in dark cold place.

[0047]**[EFFECT OF THE INVENTION]**

Preventive and therapeutic agent which contains rhM-CSF, rhG-CSF or rhEPO of this invention as an active ingredient, Since it has a cell survival extension action and ChAT activation action which were excellent and side effects are low, it is useful as a pharmaceutical used for the various disease by the cerebral-function damage including an Alzheimer's disease, the Alzheimer type senile dementia, or a cerebrovascular dementia.

【図面の簡単な説明】

[BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]

【図 1】

図 1 は実験例〔3〕で得られた脳内 *in vivo* モデルにおける rhEPO の細胞生存延長効果を示すグラフ図であり、図中、縦軸は細胞の相対的な生存率を、また、横軸は実験群をそれぞれ示す。

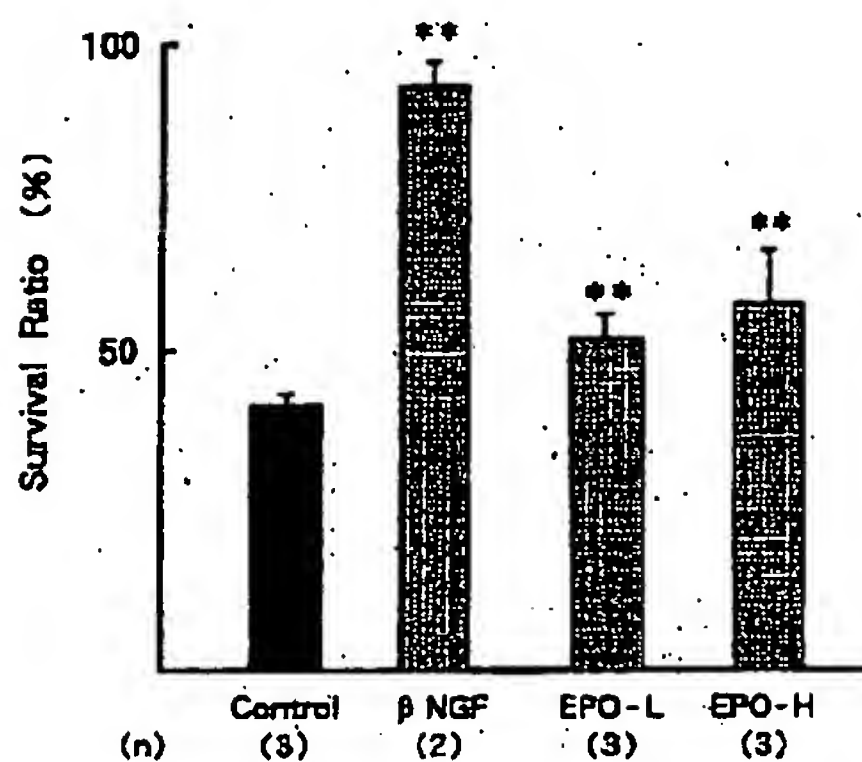
[FIGURE 1]

Figure 1 is a graph which shows the cell survival extension effect of rhEPO in *in vivo* model in a brain obtained in the example [3] of experiment.

A vertical axis shows the relative survival rate of a cell in the figure. Moreover, a horizontal axis shows the experimental group.

【図 1】

[FIGURE 1]



JP5-246885-A



DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

WWW.DERWENT.CO.UK (English)
WWW.DERWENT.CO.JP (Japanese)

(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)
(12) [Document] Japanese Unexamined Patent Publication (A)
(11) [Publication Number of Unexamined Application] Japanese Unexamined Patent Publication
H5-246885
(43) [Publication Date] September 24th, 1993
(54) [Title of Invention] PREVENTING AND THERAPEUTIC AGENT FOR DISORDERS DUE
TO CEREBRAL DYSFUNCTIONS
(51) [International Patent Classification 5th Edition] A61K 37/24 8314-4C 37/02 8314-4C
[Request for Examination] Not requested
[Number of Claim] 3
[Number of Page in Document] 9
(21) [Application Number] Japanese Patent Application H4-357539
(22) [Application Date] December 24th, 1992
(31) [Priority Application Number] Japanese Patent Application H3-356662
(32) [Priority Date] December 26th, 1991
(33) [Priority Country] Japan (JP)
(71) [Applicant]
[Applicant Code] 000003311
[Name] CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
[Address] 5-1, 5-Chome, Ukima, Kita-ku, Tokyo
(72) [Inventor]
[Name] Tahira, Takeshi
[Address] 1-20, 4-1-1, Ogawahigashi-machi, Kodaira, Tokyo
(72) [Inventor]
[Name] Konishi, Yoshihiro
[Address] 1-1-6-101, Kanno-machi, Koganei, Tokyo
(74) [Agent]
[Patent Agent]
[Name] Naruse, Katsuo (two others)

[Detail Description of Invention]
[0001]
[Field of Invention]

An object of the present invention is to provide an agent to prevent and treat disorders due to cerebral dysfunctions, and specifically to provide the agent comprising erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor as an active component.

[0002]

[Prior Art]

Disorders due to cerebral dysfunctions including hereditary and fast-progressive Alzheimer diseases; non-hereditary and slow-progressive Alzheimer type senile dementia occurring in old people; and cerebral blood vessel dementia including such as memory disorder, intelligence disorder, losing conation, and dispersion accompanying with such as cerebral ischemia disorder including such as cerebral infarction and cerebral hemorrhage, and cerebral circulation disorder; are known. It is characteristics that these disorders are obviously accompanying with memory disorder at their early stage, which are considered due to relatively selective denaturalization and exfoliation of choline active neuron of basal ganglia at the early stage of disorder progression. These disorders due to cerebral dysfunctions are becoming social issues in accordance with rapid increasing senility population, and development of agent to fundamentally prevent and treat these disorders are being emerged for pharmaceutical industry.

[0003]

There are many studies in many areas regarding mechanisms of these disorders and developments for agents, and developments of agents have been tried. For example, the use of acetylcholine precursors or acetylcholinesterase inhibitors inhibiting acetylcholinesterase activity of acetylcholine breaking enzyme to increase acetylcholine in the brain have been proposed, and as in fact, the use of such as physostigmine and tetrahydro aminoacridine as an acetylcholinesterase inhibitor has been proposed. However, the treatment effect of these agents against disorders, including such as Alzheimer type senile dementia, due to cerebral dysfunctions, is not satisfactory, and undesirable adverse effects are issues to be solved.

[0004]

Recently, instead of the use of the aforementioned acetylcholinesterase inhibitors, the use of an composition having acetylcholine tranferase activity (ChAT activity) that activates the activity of acetylcholine transferase (ChAT), which is an acetylcholie synthesis enzyme, has been

proposed. Actually, for example, a composition comprising interleukin-3 (IL-3) to prevent and treat senile dementia (Japanese Patent Laid Open H3-93728, Kamegai et. al., Neuron, 1990 (March), 4, p. 429-436, and Kamegai et. al., Brain Research, 1990, 532, p. 323-325); Effectiveness of nerve growth factor (NGF) on sympathetic nerve, sensory nerve, and procephalon choline active neuron that stimulates differentiation, and maturation, and is effective on survival and maintaining functions (Dev. Brain Res. 1983, 9, p. 45-52), Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) having in vitro activity as nutritional factor for nerve (Kamegai et. al., Brain Research, 1990, 532, p. 323-325) have been reported.

[0005]

[Object of Invention]

We noticed that it is characteristics that disorders due to cerebral dysfunctions are accompanying with memory disorder at their early stage, and, relatively and selectively, choline active neuron of basal ganglia denatures and exfoliates, and accordingly we studied to develop agents to prevent and treat denaturalization and exfoliation of choline active neuron, and accordingly we discovered that erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and macrophage stimulating factor have excellent cell survival prolongation activity and acetylcholine transferase stimulating activity and are effective on prevention and treatment for disorders due to cerebral dysfunctions, and accordingly we could complete the present invention.

[0006]

Accordingly, an object of the present invention is to provide agents effective on prevention and treatment of various disorders due to cerebral dysfunctions. Further, an object of the present invention is to provide agents effective on prevention and treatment of disorders, which can be effectively treated with cell survival prolongation activity and acetylcholine transferase stimulating activity. Furthermore, an object of the present invention is to provide agents effective on prevention and treatment of Alzheimer disorders, Alzheimer type senile dementia, and cerebral blood vessel dementia.

[0007]

[Means to solve the issues]

The present invention is related to agents to prevent and treat disorders due to cerebral

dysfunctions, which comprises one or more hematopoiesis factors selected from erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor as an active component.

[0008]

Any method for manufacturing the hematopoiesis factor selected from erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor as an active component can be applied as far as they have an essential activity as an hematopoiesis factor. Specifically, an extraction from natural product and a manufacturing method using gene-splicing technology can be applied. And a transformed cell can be either prokaryocyte or eucaryocyte.

[0009]

Specifically, erythropoietin (EPO) can be, for example, the natural human EPO extracted from human urine of aplastic anemia patient (Japanese Patent H1-38800), or manufactured using gene-splicing technology to produce EPO in an appropriate host (such as a bacteria including *Escherichia coli*, a yeast, a plant cell line, and an animal cell line including such as COS cell, Chinese hamster ovarian cell (CHO), and mouse C-127 cell) following collection of messenger RNA (m-RNA) corresponding to human EPO amino acid sequence and preparing a recombinant DNA using the mRNA (for example, Japanese Patent H1-44317), Kenneth Jacob et. al., Nature, 1985, 313, p.906-810). Concretely, for example, there are human urine EPO and rhEPO/CHO EPO that are produced in Chinese hamster ovarian cell (CHO) as a host.

[0010]

Further, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) can be a natural human G-CSF obtained by extraction, separation and purification from a cultural supernatant of human G-CSF producing cell line culture (Japanese Patent H1-44200), or by isolation and purification, or chemical modification of product from the transformant obtained by transformation of the host such as *Escherichia coli* and animal cells using gene-splicing technology. (For example, Japanese Patent H2-5395, Japanese Patent Laid Open S62-129298, Japanese Patent Laid Open S62-132899, Japanese Patent Laid Open S62-236488, and Japanese Patent Laid Open S64-85098) Concretely, for example, a natural human G-CSF, and rhG-CSF/CHO that are gene recombinant human G-CSFs produced in Chinese hamster ovarian cell as the host and

rhG-CSF/*E. coli* that is a gene recombinant human G-CSF produced in *Escherichia coli* (*E. coli*) as the host can be applied.

[0011]

Further, macrophage colony stimulating factor (M-CSF) can be a natural human M-CSF obtained by extraction, separation and purification from human urine (for example, Japanese Patent Laid Open S64-22899, Japanese Patent Laid Open H3-10921), or produced by gene-splicing technology (for example, Japanese Patent Laid Open S62-501607). Concretely, for example, a natural human M-CSF, and rhM-CSF/CHO that are gene recombinant human M-CSFs produced in Chinese hamster ovarian cell as the host and rhM-CSF/*E. coli* that is a gene recombinant human M-CSF produced in *Escherichia coli* (*E. coli*) as the host can be applied.

[0012]

Considerable administration route of such as EPO, G-CSF or M-CSF is a surgical direct administration of the agent into the brain, a cerebrospinal fluid direct administration of the agent into the cerebrospinal fluid, possibly, and possibly intravenous injection.

[0013]

While the dose of EPO, G-CSF and M-CSF can be decided appropriately under considering target disorders and symptoms, the dose of EPO should be in the range of 0.1 - 500 μ g for an adult patient, and preferably in the range of 5 - 100 μ g; the dose of G-CSF is in the range of 0.1 - 100 μ g for an adult patient and preferably in the range of 1 - 700 μ g; and the dose of M-CSF is in the range of 0.1 - 1000 μ g, for an adult patient and preferably in the range of 1 - 700 μ g.

[0014]

Further, if it is necessary in accordance with administration method and/or formulation, such as a suspending agent, a solubilizing agent, a stabilizing agent, an isotonizing agent, a preservative, and an absorption inhibitor can be added to the composition of the present invention comprising EPO, G-CSF and/or M-CSF as an active component. For example, suspending agents may include methylcellulose, polysorbate 80, hydroxyethylcellulose, gum Arabic, gum tragacanth, sodium carboxymethylcellulose, and polyoxyethylenesorbitan monolaurate; solubilizing agents may include polyoxyethylene hardening castor oil,

polysorbate 80, nicotinamide, polyoxyethylenesorbitanmonolaurate, magrogoal, and castor oil fatty acid ester; stabilizing agents may include human serum albumin, dextran 40, methylcellulose, gelatin, sodium sulfite, and sodium meta sulfite; isotonicizing agents may include D-mannitol and sorbitol; preservatives may include para-oxymethylbenzoic acid, para-oxylethylbenzoic acid, sorbic acid, phenol, cresol, and chlorocresol; absorption inhibitors may include human serum albumin, lecithin, dextran, ethylene oxide – propylene oxide copolymer, hydroxypropylcellulose, methylcellulose, polyoxyethylene hardening castor oil, polyethylene glycol.

[0015]

We describe examples to confirm the effects of the present invention.

(1) Septal area including forebrain basal area was obtained from the BALB/mouse in adjusted prenatal period 15 days of the first stage culture cell (Sankyo Jikken Service, Tokyo). The tissues extirpated and cut in Hanks balanced salt solution (HBSS solution, pH 7.4) were treated with HBSS solution (pH 6.5) containing 0.03% of trypsin for 3 minutes at 37°C. After the solution was filtered through 63µm nylon mesh, the filtrate was suspended in non-serum medium. The initial cell number for culture was 10⁵ cells/mL. 100 ng/mL of mouse βNGF (mβNGF, Sigma, MS, U. S. A.), 10 CFU/mL, 50 CFU/mL or 100 CFU/mL of recombinant human macrophage colony stimulating factor (rhM-CSF) (Genzyme, MA, U. S. A.), 10 CFU/mL, 50 CFU/mL or 100 CFU/mL of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) (Chugai Pharmaceutical), or 1 IU/mL, 5 IU/mL or 10 IU/mL of recombinant human erythropoietin (Chugai Pharmaceutical) were added respectively followed by exchanging culture medium after 3 days, collecting cells with rubber policeman (a tool having rubber connected to the tip of glass tube) after 5 days, and measuring choline acetyltransferase (ChAT) activity by the following method. The results are shown in Table 1. Non-serum medium was 1 to 1 mixture of Dulbecco modified eagle medium (DMEM) (Gibco, NY U. S. A.) containing 4.5g/L of glucose and HamG12 (Gibco), pH 7.4, that the following contents were added to. Specifically, these are 15mM of HEPES buffer solution, 30nM of sodium selenic acid, 1% solution of penicillin-streptomycin (Gibco), 100µg of human transferrin, 25µ/mL of bovine crystal insulin, 20nM of progesterone, 20nM of hydrocortisone-21-phosphate, 10mM of L-carnitine, 30nM of 3, 3', 5 – triiodo-L-thyronine, 7ng/mL of tocopherol, 7ng/mL of retinal, 1µM of thiocetic acid and 1µl/mL of mineral mixture [Hutchings et. al. Proc. Nat. Acad. Sci. 1978, 75, p. 901-904] Compounds used are purchased from Sigma (LI or MS, U. S. A.) unless it is specially noted.

[0016]

(2) Preparation of SN 6.10.2.2: SN6.10.2.2 cells given by Dr. Weiner, Chicago University, U.S. A. where the cell line of SN6.10.2.2 has being maintained, is a sub-clone of SN6 cells [Hamond et. al., Science, 1986, 234, 1237-1240] established as a fused hybrid cell line of mouse septal area nerve cells and mouse neuroblast N18T. The cells have been maintained in DMEM containing 10% bovine fetus serum. Prior to use, 2×10^5 of the cells were washed twice with HBSS solution (pH 7.4) and once with non-serum medium. The cells were cultivated for 2 days in the 35mm dish (Becktondekinnson, NJ, U. S. A.) and then the cells were collected by using a rubber policemen at the third day followed by measuring ChAT activity by the following method. The results are shown in Table 2.

[0017]

(3) Preparation of in vivo model inside brain by cutting fimbria – fornix: Wister albino male rats, 300 – 350g of body weight, (Nihon Crea, Tokyo) were anesthetized with 30 – 50 mg of sodium pentobarbital and the head was fixed with the brain orientation apparatus (Narishige Kikai, Tokyo) followed by cutting fimbria – fornix using the following procedure. A 3 square mm part having orthogonal side lines of the 5mm backward line from bregma of the left skull and center line was cut and removed with fimbria and fornix of the left behind side, and cortex by suction. A hole was bored at the position of 0.2 mm forward of the right skull bregma and 1 mm right of the center, and 1 mm diameter cannula (Kunii, Tokyo) was inserted to the hole. The two doses of rhEPO, respectively 125 IU/15 μ l/day and 12.5 IU/15 μ l/day were administered to the group of three rats for 4 days in a row. The 5 μ g/15 μ l/day of β NGF or 15 μ l/day of saline solution were administered to the control group rats under the same condition.

[0018]

The 2mg/kg of diisopropyl-fluorophosphates was intramuscularly injected to the rats at 14th day after surgery, and perfusion of the cooled 0.1M phosphate buffer solution containing 100mL of saline solution, 300mL of 4% para-formaldehyde, and 0.1% of glutaraldehyde was carried out. The brain extracted was fixed with 2% of zamboni solution for days and then stood in 10% sucrose solution over night at 4°C. The 20 μ m thickness of brain coronal slice was prepared and stained with the alternative Butcher method [Butcher et. al., Neuron, 1991, 7, 197-208. According to Gage method [Gage et. al., Neuroscience, 1986, 19, 241-255],

acetylcholinesterase (AChE) positive cells, which are nerve cells having minimum diameter 12µm along with main axis of inside septal area were examined by image analysis software (Olympus, Tokyo). In septal areas of both cutting site and opposite site of individual animal's fimbria – fornix, numbers of AChE positive cells were obtained and the survival rate of acetylcholine active nerve cells was calculated as a percentage of AChE positive cell number in the cutting site by cell number in the opposite site. The results are shown in Fig. 1. In Fig.; the column represents Mean \pm 1 S.D., ** represents $P < 0.01$; EPO-H represents the group administered 125 IU/15µL/day, EPO-L represents the administered 12.5 IU/15µL/day.

[0019]

(4) Measurement of choline acetyltransferase (ChAT) activity and quantification of protein: ChAT activity was obtained by Fonnum method [F. Fonnum, J. Neurochem., 1975, 24, 407]. Specifically, the above first culture cells or SN 6.10.2.2 culture cells were collected by a rubber policeman, and homogenized with 30µL of 10mM of EDTA followed by adding the final concentration 0.5% of triton – X100 in order to give the enzyme source. The enzyme reaction solution contains 300 mL of NaCl, 50mM of sodium phosphate buffer solution (pH 7.4) and 20mM EDTA; and 2mM of [1-¹⁴C]acetyl-CoA (Amasham Japan) as the substrate, 8mM of choline bromide, and 0.1mM of physostigmine as an acetylcholine esterase inhibitor. The enzyme solution, 2µL, was added to 5µL of the reaction solution in a 5mL microtube (Eppendorf, Germany), and the solution was lightly stirred and reacted for 15 minutes at 37°C. The reaction was terminated by ice-cooling; the microtube was put into a vial for the liquid scintillation counter; the reaction mixture inside the tube was washed out with 5mL of 10mM phosphate buffer solution. Acetonitrile, 2mL, and 10mL of toluene-type scintillator containing 10mg/mL of sodium tetraphenylborate, were added to the above vial and stirred lightly for a minute. After standing for 10 minutes, the amount of acetylcholine labeled with ¹⁴C was determined by the scintillation counter to obtain the ChAT activity.

[0020]

The quantification of protein was carried out using Lowry method. [Lowry et. al., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275] For this purpose, 10µL of the above enzyme solution was employed. Based on these values, the specific activity, the total protein and the total ChAT activity were calculated. T-test was carried out for ChAT activity, protein concentration and survival rate.

[0021]

Table 1.

[Table 1]

	n	ChAT specific activity (P moles/mg/min) (means \pm SD)	Relative ChAT specific activity	Total protein (μ g/well) (means \pm SD)	Relative total protein	Total ChAT activity (P moles/ μ l/well)	Relative total ChAT activity
Control	5	13.2 \pm 0.9	100	119.5 \pm 19.9	100	93.9 \pm 11.0	100
m β NGF (mg/mL) 100	4	21.3 \pm 2.2	161	146.7 \pm 25.6	123	185.3 \pm 23.1	197
hM-CSF (CFU/mL) 10 50 100	3 3 3	12.8 \pm 2.4 15.5 \pm 0.7 15.5 \pm 0.7	97 117 117	148.7 \pm 17.6 171.7 \pm 16.1 187.8 \pm 2.3	125 144 115	112.3 \pm 14.1 159.4 \pm 13.5 128.1 \pm 8.2	120 170 137
hG-CSF (CFU/mL) 10 50 100	3 3 3	13.3 \pm 1.9 16.5 \pm 2.7 15.0 \pm 1.5	101 125 114	133.5 \pm 32.4 147.8 \pm 12.4 140.8 \pm 15.8	112 124 118	107.2 \pm 31.3 145.1 \pm 20.1 125.2 \pm 4.0	114 155 133
hEPO (IU/mL) 1 5 10	3 3 3	11.9 \pm 0.8 15.9 \pm 2.3 13.6 \pm 0.7	90 120 118	157.0 \pm 21.2 149.5 \pm 20.5 164.6 \pm 31.3	131 125 138	111.5 \pm 8.1 140.3 \pm 5.0 152.4 \pm 22.7	119 149 162

(ChAT specific activity of sample)

$$a : \text{Relative ChAT specific activity} = \frac{\text{(ChAT specific activity of sample)}}{\text{(ChAT specific activity of control)}} \times 100$$

$$\text{b: Relative total protein} = \frac{(\text{Total protein of sample})}{(\text{Total protein of control})} \times 100$$

$$\text{c: Total ChAT activity} = \text{ChAT specific activity} \times \text{Total protein}$$

$$\text{d: Relative ChAT activity} = \frac{(\text{Total ChAT activity of sample})}{(\text{Total ChAT activity of control})} \times 100$$

[0022]

Table 2.

		ChAT specific activity (P moles/mg/min)	Relative ChAT specific activity	Total protein (μg/well)	Relative total protein	Total ChAT activity (P moles/μl/well)	Relative total ChAT activity
Control	1	20.2	100	147.1	100	170.2	100
hM-CSF (CFU/mL) 50	1	34.1	168	157.1	107	322.2	180
hG-CSF (CFU/mL) 50	1	32.6	161	146.0	100	283.5	158
hEPO (CFU/mL) 10	1	36.5	180	142.0	97	311.7	174

a, b, c, and d are the same as in Table 1.

[0023]

As shown in Table 1, it is obvious that after 5 days from when the doses shown in Table of rhM-CSF, rhG-CSF or rhEPO of the present invention were added, ChAT specific activity, total protein and total ChAT specific activity showed that rhM-CSF increased the total protein by 25%,

44% and 15% more than the control at the doses of 10CFU/mL, 50CFU/mL, and 100CFU/mL respectively; rhG-CSF increased the total protein by 12%, 24% and 18% more than the control at the doses of 10CFU/mL, 50CFU/mL, and 100CFU/mL respectively; and rhEPO increased the total protein by 31%, 25% and 38% more than the control at the doses of 1 IU/mL, 5 IU/mL, and 10 IU/mL respectively. These increase rates are equal or better in comparison with mβNGF (100ng/mL) and it is obvious that the hematopoiesis factor of the present invention has the similar effect of nerve nutritional factor like mβNGF that promotes survival of the primary culture nerve cells.

[0024]

Further, rhM-CSF increased ChATspecific activity by 17% more than the control at the doses of 50CFU/mL, and 100CFU/mL respectively; rhG-CSF increased by 1%, 25% and 14% more than the control at the doses of 10 CFU/mL, 50 CFU/mL and 100 CFU/mL; and rhEPO increased by 20% and 18% at the doses of 5 IU/mL and 10 IU/mL respectively. Further, rhM-CSF increased the total ChAT activity by 20%, 70% and 37% more than the control at the doses of 10CFU/mL, 50CFU/mL, and 100 CFU/mL respectively; rhG-CSF increased by 14%, 55% and 33% more than the control at the doses of 10 CFU/mL, 50 CFU/mL, and 100 CFU/mL respectively; and rhEPO increased the total protein by 19%, 49% and 62% more than the control at the doses of 1 IU/mL, 5 IU/mL, and 10 IU/mL respectively. These increase rate are equal or better in comparison with mβNGF (100ng/mL) and it is obvious that the hematopoiesis factor of the present invention has an excellent effect on ChAT promoting activity.

[0025]

Further, the effect of rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO of the present invention on ChAT specific activity, the total protein and the total ChAT activity are shown in Table 2. In this system, since total proteins are almost as the same between control group and group with hematopoiesis factor, the effect of hematopoiesis factor only on differentiated characteristics can be observed. It is obvious that rhM-CSF (50 CFU/mL), rhG-CSF (50 CFU/mL) and rhEPO (10 IU.mL) increased the ChAT specific activity by 61%, 68% and 80% respectively and the total ChAT activity by 80%, 58% and 74% respectively.

[0026]

As shown Fig. 1, in the group administered rhEPO, the survival rate of AchE positive cells at the septal area of the rats with fimbria – fornix cut in one side significantly improved compared to the control group (saline, 0.1% BSA). Confirmation of the effect of rhEPO on acetylcholine active nerve cells in vivo is significantly important for practical clinical trial.

[0027]

[Mechanisms]

" From the abovementioned experiments, it is obvious that although the rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO, which originally were discovered as a hematopoiesis agent to have an activity on the blood cells, they have similar activity like mβNGF on the central nerve cells. Specifically, they increased remarkably the total protein of in vitro primary culture of the septal area nerve cells of mouse, and also increased the ChAT specific activity and the total ChAT activity; and also increased the ChAT specific activity and the total ChAT activity of SN 6.10.2.2 cells, a choline active nerve cell line established from the septal area nerve cells of mouse. Accordingly, these hematopoiesis factors, rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO have both excellent cell survival prolongation activity and ChAT promotion activity. Further, in vivo experiments, the effect supporting survival of acetylcholine active nerve cells in fimbria – fornix neural pathway cut model was observed. In this model, the supply of the NGF produced in hippocampus and reversely being transported in axon is interrupted by the cut, and accordingly the NGF could not be supplied to acetylcholine active nerve cells, and accordingly the cells would die. Accordingly, it became obvious that the rhEPO had neurotrophic factor activity like NGF. "

[0028]

Accordingly, rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO of the present invention are effective on the disorders due to denaturalization and exfoliation of choline active nerve cells which causes memory disorder, for example, such as Alzheimer diseases and Alzheimer type senile dementia, and additionally, are effective on memory disorder, intelligence disorder, loosing conation, and dispersion accompanying with such as cerebral ischemia disorder including such as cerebral infarction and cerebral hemorrhage, and cerebral circulation disorder. But the applicable disorders of the hematopoiesis factors, rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO are not limited to the abovementioned disorders related to the choline active nerve cells. Further, the action of mβNGF to the central nervous system is limited to rather narrow cell selectivity peripheral sympathetic nerve or sensory nerve, and choline active nerve in brain, but rhM-CSF, rhG-CSF

and rhEPO of the present invention are originally related factors to blood cells and considered to have possibility to act for broad kinds of nerve cells in brain as survival promotion factor, and this is considered the factors to provide excellent cell survival prolongation activity. Accordingly, rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO of the present invention are not limited not only to the disorders related to choline active nerve cells, but also are being promised to prevent and treat, for example, Parkinson diseases due to denaturalization and exfoliation of cerebral basal nigra dopamine active nerve cells, Huntington chorea due to denaturalization and exfoliation of GABA active nerve cells, and disorders due to widely brain function disorders.

[0029]

[Embodiment] The followings are formulation examples.

Embodiment 1. Erythropoietin, 8 μ g, was diluted with injection-distilled water to 2mL with the above formula, prepared under sterilization condition, fractioned to vials and sealed.

[0030]

Embodiment 2. Erythropoietin, 8 μ g, was diluted with injection-distilled water to 2mL with the above formula, prepared under sterilization condition, fractioned to vials, freeze-dried and sealed.

[0031]

Embodiment 3. Erythropoietin, 16 μ g, was diluted with injection-distilled water to 2mL with the above formula, prepared under sterilization condition, fractioned to vials and sealed.

[0032]

Embodiment 4. Erythropoietin, 16 μ g, was diluted with injection-distilled water to 2mL with the above formula, prepared under sterilization condition, fractioned to vials, freeze-dried and sealed.

[0033]

Embodiment 5. Erythropoietin, 8 μ g, and human serum albumin, 5mg, were diluted with injection-distilled water to 2mL with the above formula, prepared under sterilization condition, fractioned to vials, and sealed.

[0034]

Embodiment 6. Erythropoietin, 8 μ g, and human serum albumin, 5mg, were diluted with injection-distilled water to 2mL with the above formula, prepared under sterilization condition, fractionated to vials, freeze-dried and sealed.

[0035]

Embodiment 7. Erythropoietin, 16 μ g, and human serum albumin, 5mg, were diluted with injection-distilled water to 2mL with the above formula, prepared under sterilization condition, fractionated to vials, and sealed.

[0036]

Embodiment 8. Erythropoietin, 8 μ g, and human serum albumin, 5mg, were diluted with injection-distilled water to 2mL with the above formula, prepared under sterilization condition, fractionated to vials, freeze-dried and sealed.

[0037]

Embodiment 9 – 12. Instead of human albumin in Embodiment 5 – 8, dextran 40, 5mg, was formulated and an injection was prepared as described in Embodiment 5 – 8.

[0038]

Embodiment 13. D-Mannitol 5g, erythropoietin 1mg, human serum albumin 100mg were dissolved in 100mL of injection-distilled water under sterilized condition, fractionated to vials for each 1mL, freeze-dried and sealed.

[0039]

Embodiment 14. Erythropoietin, 0.5mg, and sorbitol, 1g were sterilely dissolved into the 0.05M phosphate buffer solution, pH.7.0, 50mL, and each 0.5mL was fractionated into a vial followed by freeze-drying and sealing. Another 0.1% aqueous solution of methyl cellulose was sterilely prepared and each 1mL was fractionated to be dissolving solution.

[0040]

Embodiment 15. Human G-CSF (10mM phosphate buffer pH 7.0), 75 μ g, and D-mannitol 15mg/mL, were dissolved in injection-distilled solution to give 0.3mL, and were sterilized through a membrane filter having 0.22 μ m pore size. The obtained solution was filled into the

sterilized vial, and was sealed with a sterilized rubber stopper followed by tightening with aluminum closure and giving injection solution. The injection solution was stored in a dark room below 10°C.

[0041]

Embodiment 16. The osmotic pressure ratio of 50µg/mL of purified human G-CSF (1mM phosphate buffer solution, pH7.0) was adjusted to 1 with NaCl and the solution was sterilized through a membrane filter with 0.22µm pore size. The obtained solution was filled into the sterilized vial, and was sealed with a sterilized rubber stopper followed by tightening with aluminum closure and giving injection solution. The injection solution was stored in a dark room below 10°C.

[0042]

Embodiment 17. The osmotic pressure ratio of 100µg/mL of purified human G-CSF (1mM phosphate buffer solution, pH7.0) was adjusted to 1 with NaCl and the solution was sterilized through a membrane filter with 0.22µm pore size. The obtained solution was filled into the sterilized vial, and was sealed with a sterilized rubber stopper followed by tightening with aluminum closure and giving injection solution. The injection solution was stored in a dark room below 10°C.

[0043]

Embodiment 18. Purified human G-CSF (10mM phosphate buffer pH 7.0), 50µg/mL, HAS with concentration of 10mg/mL, and D-mannitol 50mg/mL, were dissolved and were sterilized through a membrane filter having 0.22µm pore size. The obtained solution was filled into the sterilized vial, and was sealed with a sterilized rubber stopper followed by tightening with aluminum closure and giving injection solution. The injection solution was stored below room temperature, and was diluted with injection-distilled water on use.

[0044]

Embodiment 19. Purified human G-CSF (10mM phosphate buffer pH 7.0), 100µg/mL, gelatin with concentration of 10mg/mL, and D-mannitol 50mg/mL, were dissolved and were sterilized through a membrane filter having 0.22µm pore size. The obtained solution was filled into the sterilized vial, and was sealed with a sterilized rubber stopper followed by tightening with

aluminum closure and giving injection solution. The injection solution was stored below room temperature, and was diluted with injection-distilled water on use.

[0045]

Embodiment 20. Purified human M-CSF (10mM phosphate buffer pH 7.0), 75µg/mL, and D-mannitol 50mg/mL, were dissolved in injection-distilled solution to give 0.3mL, and were sterilized through a membrane filter having 0.22µm pore size. The obtained solution was filled into the sterilized vial, and was sealed with a sterilized rubber stopper followed by tightening with aluminum closure and giving injection solution. The injection solution was stored in a dark room below 10°C.

[0046]

Embodiment 21. The osmotic pressure ratio of 50µg/mL of purified human M-CSF (1mM phosphate buffer solution, pH7.0) was adjusted to 1 with NaCl and the solution was sterilized through a membrane filter with 0.22µm pore size. The obtained solution was filled into the sterilized vial, and was sealed with a sterilized rubber stopper followed by tightening with aluminum closure and giving injection solution. The injection solution was stored in a dark room below 10°C.

[0047]

[Effects of the present invention] The preventing and therapeutic agents comprising rhM-CSF, rhG-CSF and rhEPO as an active agent have excellent cell survival prolongation activity, ChAT promotion activity and less adverse effect, and accordingly are effective on application for cerebral disorders including such as Alzheimer diseases, Alzheimer type senile dementia and cerebral blood vessel dementia as a medicine. 57)

[Abstract]

[Objects]

An object is to provide effective agents to prevent and/or treat disorders including such as Alzheimer diseases, Alzheimer type senile dementia and cerebral blood vessel dementia due to various cerebral dysfunctions, wherein disorders can be effectively treated with a composition having cell survival prolongation activity and/or acetylcholine transferase promoting activity.

[Composition]

The preventing and therapeutic agents comprising hematopoiesis factors selected one or more or erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor as an active component for disorders due to cerebral dysfunctions.

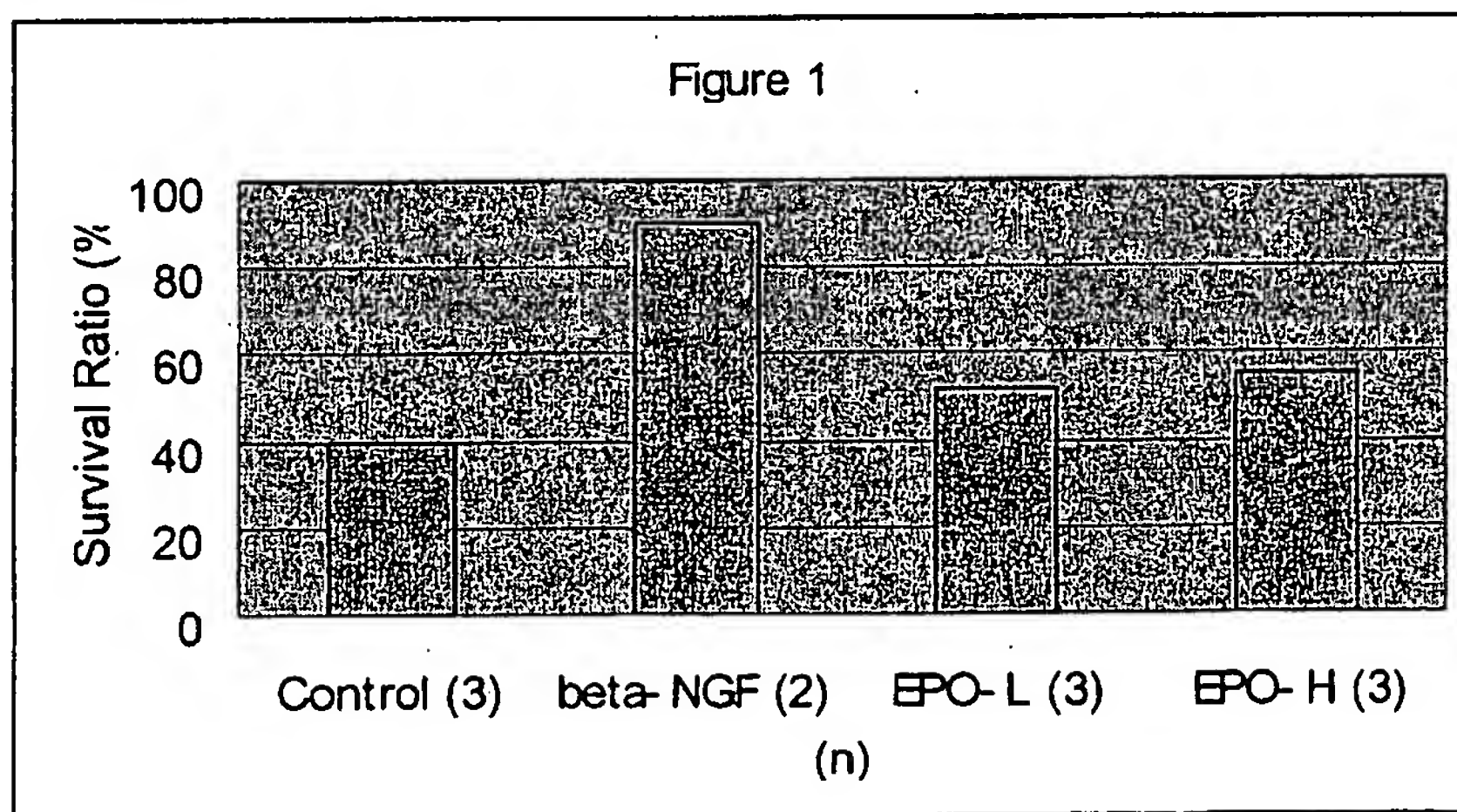
[Effectiveness]

The composition containing of excellent cell survival prolongation activity, ChAT promotion activity and less adverse effect, and accordingly are effective on application for cerebral disorders including such as Alzheimer diseases, Alzheimer type senile dementia and cerebral blood vessel dementia as a medicine.

[Explanation of Figure]

[Fig 1]

Fig 1 shows the results of brain in vivo model experiment obtained in Embodiment 3 regarding cell survival prolongation activity. Y-axis represents relative survival rate and x-axis represents each group.



[What is claim.]

[Claim 1]

The preventing and therapeutic agents comprising hematopoiesis factors selected one or more erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and macrophage colony stimulating factor as an active component for disorders due to cerebral dysfunctions.

[Claim 2]

The preventing and therapeutic agents for dementia due to cerebral dysfunctions according to Claim 1; wherein said disorders due to said cerebral dysfunctions are effectively treated with cell survival prolongation activity and/or acetylcholine transferase activity.

[Claim 3]

The preventing and therapeutic agents for disorders due to cerebral dysfunctions according to Claim 1; wherein said disorders are Alzheimer diseases, Alzheimer type senile dementia, or cerebral blood vessel dementia.